



**Joana Sá Ramalho
Simões**

**Caracterização estrutural das mananas do resíduo
de café como fonte de compostos com actividade
imunomoduladora**



**Joana Sá Ramalho
Simões**

**Caracterização estrutural das mananas do resíduo
de café como fonte de compostos com actividade
imunomoduladora**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química e Qualidade dos Alimentos, realizada sob a orientação científica do Doutor Manuel António Coimbra, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Maria do Rosário Domingues, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Aos meus pais.

o júri

presidente

Prof. Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo
professora associada com agregação da Universidade do Aveiro

Prof. Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva
professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria do Rosário Gonçalves Reis Marques Domingues
professora auxiliar da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Fernando Hermínio Ferreira Milheiro Nunes
professor auxiliar da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

agradecimentos

Agradeço ao Doutor Manuel António Coimbra, do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, por ter aceite a orientação deste trabalho, pela proposta do tema de investigação e pela ajuda, apoio e entusiasmo dispensado.

Agradeço à Doutora Rosário Domingues, do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, por ter aceite a orientação deste trabalho, pela ajuda, empenho e incentivo constante.

Agradeço ao Doutor Manuel Vilanova do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Faculdade do Porto pela orientação no estudo das actividades imunomoduladoras.

Agradeço ao Doutor Fernando Nunes da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro pela colaboração prestada.

Agradeço ao iBeSa- Instituto de Bebidas e Saúde pela bolsa de apoio à realização deste mestrado.

Agradeço à Cláudia Nunes e ao Pedro Madureira pela ajuda e conhecimentos transmitidos.

Agradeço a todos os colegas do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, pelo apoio e companheirismo.

Agradeço, de uma forma muito especial, aos pais incansáveis e dedicados, à família sempre presente, ao Nuno e aos amigos.

palavras-chave

manana, resíduo de café, café, *Aloe vera*, espectrometria de massa, actividade imunomoduladora.

resumo

Neste estudo foram obtidas mananas provenientes do resíduo de café por extracção sequencial com água quente, um agente quelante e soluções alcalinas de NaOH e derivatização por acetilação de modo a torná-las solúveis em soluções aquosas.

As fracções de mananas acetiladas obtidas foram analisadas quanto à quantidade e tipo de açúcares e ao seu grau de acetilação e foram também caracterizadas estruturalmente por Espectrometria de Massa Tandem (MS/MS) de iões formados em ESI (ionização por electrospray).

A acetilação das mananas do resíduo de café ocorreu preferencialmente nas cadeias laterais constituídas por resíduos de galactose e de arabinose, apesar de também serem encontrados resíduos de manose acetilados.

As mananas acetiladas do resíduo de café e as mananas isoladas e purificadas a partir de infusões preparadas do grão de café sujeito a dois diferentes graus de torra, suave e forte, foram utilizadas para testar o seu efeito imunomodulador. Como padrão de comparação usou-se as acemananas bioactivas de *Aloe vera*. As mananas do resíduo e das infusões de café apresentaram estimulação de linfócitos B e de linfócitos T de ratinhos, avaliados pela sua expressão *in vitro* de marcadores de activação de superfície. Este efeito foi mais marcado nos linfócitos B que nos T, não tendo, contudo, havido um efeito proliferativo. As mananas testadas não apresentaram indução da activação de macrófagos nem indução de efeito imuno-supressivo *in vitro*.

Os ensaios *in vivo* realizados, ainda preliminares dado o reduzido número de réplicas, estão de acordo com as observações feitas *in vitro*, nomeadamente, a activação de linfócitos B e T sem proliferação de células.

Apesar do padrão de acetilação das mananas do resíduo de café ser diferente do das infusões de café e do *Aloe vera*, os resultados obtidos mostram que estas mananas têm propriedades imunomoduladoras comparáveis entre si.

keywords

mannan, coffee residue, coffee, *Aloe vera*, mass spectrometry, immunomodulatory activity.

abstract

In this study, mannans were obtained from coffee residue by sequential extraction with hot water and alkali solutions and were acetylated to allow their solubilization in water solutions.

The fractions of acetylated mannans obtained were analysed in order to identify and quantify their composition in sugars and the degree of acetylation. They were also structurally characterized by Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) of ions formed by ESI (ionization by electrospray).

The chemical acetylation of the mannans of coffee residue occurred preferentially in the galactose and arabinose side chain residues, although mannose residues were also found,

The acetylated mannans from coffee residue and from coffee infusions of coffee beans submitted to two different degrees of roast, light and dark, were used to study their potential immunomodulatory activity. *Aloe vera* bioactive acemannan was used for comparison.

The mannans from coffee infusions and coffee residue were shown to stimulate murine B and T lymphocytes, as evaluated by *in vitro* expression of surface lymphocyte activation markers. This effect was more marked on B than on T lymphocytes, without a noticed proliferative effect. The mannans did not induce *in vitro* macrophage activation neither immunosuppressive effect. *In vivo* assays, although preliminary due to the reduced number of replicates, are in accordance to *in vitro* observations, showing activation of B and T lymphocytes without cell proliferation.

Although the acetylation pattern of coffee residue mannans was different from the one presented by coffee infusions and *Aloe vera*, the results obtained suggest that those mannans have comparable immunomodulatory properties.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos

Abstract

Resumo

Índice geral I

Abreviaturas e símbolos III

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

1.1.Café	3
1.1.1. Caracterização do café	3
1.1.2. Polissacarídeos do café	5
1.2. Espectrometria de massa na caracterização de oligossacarídeos	6
1.3. Efeito imunomodulador dos polissacarídeos das plantas	8
1.4 Enquadramento e Objectivos do trabalho	11

CAPÍTULO 2- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Identificação das amostras de mananas estudadas	15
2.2 Determinação da percentagem de humidade do resíduo de café	16
2.3. Isolamento e preparação dos extractos de alto peso molecular do resíduo de café....	17
2.4. Análise de açúcares por GC-FID	19
2.5. Acetilação do extracto rico em mananas do resíduo de café	20
2.6. Determinação do grau de acetilação das mananas acetiladas	22
2.7. Hidrólise e caracterização estrutural por ESI-MS e MS/MS das mananas acetiladas do resíduo de café	23
2.7.1. Hidrólise enzimática	23
2.7.2. Cromatografia de exclusão molecular- Biogel P2	23
2.7.3. Espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MS e MS/MS)	24
2.8. Investigação do potencial efeito imunodulador das mananas	24
2.8.1. Remoção dos lipopolissacarídeos das amostras	25
2.8.2. Ensaio de activação de linfócitos B e T	25

2.8.3. Ensaio de proliferação de células	26
2.8.3.1. Ensaio de indução de produção de citocina IL10	27
2.8.4. Ensaio de activação de macrófagos	28
2.8.5. Ensaio <i>in vivo</i>	29
 CAPÍTULO 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.1. Caracterização da amostra de resíduo de café	33
3.2. Fraccionamento do material de alto peso molecular por extracção com soluções alcalinas	34
3.3. Acetilação de extractos ricos em mananas do resíduo de café e caracterização das mananas acetiladas	37
3.4. Caracterização de mananas acetiladas obtidas do resíduo de café por espectrometria de massa	42
3.4.1. Análise de espectros de ESI-MS	42
3.4.2. Análise de espectros de ESI-MS/MS	48
3.4.2.1. ESI-MS/MS de Hex _n Ac _x	49
3.4.2.2. ESI-MS/MS de Hex _n Pent _m Ac _x	53
3.5. Investigação do potencial efeito imunomodulador das mananas do café, nativas e acetiladas	58
3.5.1. Avaliação da activação de linfócitos B	58
3.5.2. Avaliação da activação de linfócitos T	61
3.5.3. Ensaio de proliferação	66
3.5.4. Ensaio de activação de macrófagos	68
3.5.5. Ensaio <i>in vivo</i>	69
 CAPÍTULO 4- CONCLUSÕES	73
CAPÍTULO 5- PERSPECTIVAS DE ESTUDOS FUTUROS	77
CAPÍTULO 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%mol	percentagem molar	LPS	lipopolissacarídeo
Ac	acetilo	<i>m/z</i>	razão massa/carga
Ara	arabinose	MALDI	ionização por desorção por laser assistida por matriz
AV1	extracto de <i>Aloe vera</i> (Healthspan, UK)	Man	manose
AV2	extracto de <i>Aloe vera</i> (Molo-Cure, USA)	min	minuto
BSA	albumina sérica bovina	MS	espectrometria de massa
CID	dissociação induzida por colisões	MS/MS	espectros de fragmentação induzida por colisões
Da	dalton	MTT	brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
Desoxi	desoxi-hexose	<i>p</i>	piranose
DP	grau de polimerização	PBS	tampão fosfato
DVB	divinilbenzeno	PDMS	polidimetilsiloxano
ELSD	“evaporative light scattering detection”	Pent	pentose
ESI	ionização por electrospray	PMA	Acetato de forbol miristato
F	fracção	RC1, RC2	fracções provenientes do resíduo de café
FID	detector de ionização de chama	RMN	espectroscopia de ressonância magnética nuclear
Fuc	fucose	rpm	rotações por minuto
Gal	galactose	SPME	microextracção em fase sólida
Glc	glucose	TCD4⁺	linfócitos T-reguladores
GC	cromatografia em fase gasosa	TCD8⁺	linfócitos T-citotóxicos
h	hora	U	unidade de enzima
Hex	hexose	UV	espectroscopia de ultravioleta
HMWM	material de alto peso molecular	Vo	volume morto
IC5, IC10	fracções ricas em mananas de infusão de café com 5 e 10 % de perda de peso pela torra	Xyl	xilose

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

1.1. O café

1.1.1. Caracterização do café

O café é uma das bebidas mais populares e apreciadas em todo o mundo devido ao seu aroma agradável e sabor forte. Cerca de 400.000 milhões de chávenas de café são consumidas por ano nos Estados Unidos da América (<http://www.top100espresso.com>). Em Portugal, o consumo anual de café ronda as 44.000 toneladas.

A bebida de café é obtida por extracção com água quente do grão de café torrado e moído. O grão de café é a semente da planta do café, o cafezeiro. O café actualmente comercializado pertence na sua grande maioria a duas espécies: *Coffea arábica* e a *Coffea canephora* variedade *robusta*. São conhecidos como café Arábica e café Robusta, respectivamente.

A torra do café consiste em submeter o grão de café a uma temperatura entre os 180 e os 230 °C durante um certo intervalo de tempo. Durante o processo de torra, os grãos de café sofrem reacções de pirólise, que levam à formação de substâncias responsáveis pelas suas qualidades sensoriais, acompanhadas por alterações físicas importantes.

A composição em polissacarídeos do grão de café é de aproximadamente 30%, sendo os polissacarídeos solúveis em água apenas 6%. A percentagem de polissacarídeos do café torrado que passa então para a solução, durante o processo de extracção, infusão da bebida do café, é cerca de 20% dos polissacarídeos totais. Verificamos que aquando da infusão de café, cerca de 80% dos polissacarídeos totais permanecem no resíduo de café (Spliller, 1998).

O café é um dos alimentos mais alterados como resultado das condições relativamente drásticas do seu processamento (Spliller, 1998). Apesar das características estruturais maioritárias das cadeias principais dos polímeros do café não serem alteradas com a torra, esta promove a formação de polissacarídeos com o terminal reductor substituído por uma série de diferentes compostos. Estes compostos são formados por caramelização, reacções de Maillard, oxidações e reacções de descarboxilação, formando resíduos de 1,6- β -anidromanose, frutose, 2-desoxiarabinose, compostos de Amadori, acetilformoína, ácido manónico, ácido 2-cetoglucónico ou ácido arabinóico, tal como descrito por Nunes *et al.* (2006). Durante a torra dos grãos de café é observado um

decréscimo do grau de ramificação e do grau de polimerização das mananas (Nunes *et al.*, 2002). Este processo promove um aumento de solubilidade, promovendo a sua extracção aquando da infusão, embora a grande maioria se mantenha no resíduo (Oosterveld *et al.*, 2002).

A moagem do café tem como principal objectivo aumentar a superfície de extracção, de forma a aumentar a extensão da interface entre a água e o sólido facilitando a transferência de substâncias solúveis para a bebida (Illy e Viani, 1995). A extracção do café torrado não é apenas uma operação física efectuada a 100 °C, ocorrendo algumas transformações químicas, nomeadamente a clivagem de polissacarídeos de elevada massa molecular, resultando na sua solubilização (Thaler, 1979), diminuição do peso molecular dos polissacarídeos extraídos com o aumento da temperatura de extracção (Leloup e Liardon, 1993) e formação de monossacarídeos por hidrólise dos polissacarídeos (Kroplin 1974). A extracção é uma operação em que ocorre transferência de massa dos componentes, que se difundem da fase sólida para a fase líquida. Desta extracção, o resíduo que permanece insolúvel denomina-se resíduo de café.

A influência da temperatura de extracção na quantidade de material extraído é muito importante no que diz respeito à extracção de material de alto peso molecular, verificando-se que existe uma solubilização progressiva dos compostos que não foram prontamente extraídos, em particular polissacarídeos, proteínas e melanoidinas (Thaler, 1979; Clarke, 1985).

A identificação completa deste resíduo é bastante difícil dada a insolubilidade dos seus constituintes. Devido a este facto não foram feitos ainda estudos exaustivos sobre a sua caracterização e composição.

Têm surgido várias tentativas para o reaproveitamento do resíduo de café, nomeadamente, a utilização como fertilizante, combustível (Silva *et al.*, 1998), ou como fonte de materiais antioxidantes (Yen *et al.*, 2005). Tendo em conta o material que passa para a infusão de café, espera-se que o resíduo seja ainda muito rico em material polimérico, particularmente polissacarídeos, podendo este ser uma fonte de compostos polissacarídicos com aplicações diversas.

1.1.2. Polissacarídeos do Café

A quantidade de polissacarídeos dos grãos de café verde é de aproximadamente metade do seu conteúdo. As arabinogalactanas são o grupo maioritário de polissacarídeos extractáveis com água quente dos grãos de café verde (Nunes e Coimbra, 2001; 2002a).

As galactomananas são polímeros que podem ser acetilados nas posições 2 e/ou 3 dos resíduos de manose. A cadeia principal, tal como a cadeia principal das galactomananas do café torrado, é constituída por resíduos de D-manose ligados por ligação β -(1 \rightarrow 4) mas com alguns resíduos de (1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp intercalados (Nunes *et al.*, 2005). Como cadeias laterais em C6 encontramos resíduos únicos de galactose e arabinose.

Após a torra, o conteúdo em polissacarídeos dos grãos de café torna-se mais extractável provavelmente devido a modificações nas estruturas dos polímeros dado que os tornam mais solúveis. O conteúdo e a natureza dos polissacarídeos que são extraídos dos grãos de café após a torra são determinantes para as características das infusões de café. Estes polissacarídeos apresentam uma influência importante na retenção de substâncias voláteis (Maier, 1975), contribuem para a viscosidade da bebida (Ehlers, 1980), contribuem para o corpo das infusões de café (Illy e Viani, 1995) e para a estabilidade da espuma das infusões de café expresso (Nunes *et al.*, 1997; Nunes e Coimbra, 1998; Petraco, 2001).

As galactomananas são o polissacarídeo maioritário das infusões de café torrado. Estas, em conjunto com as arabinogalactanas, são os componentes maioritários do material extractável com água quente (Nunes e Coimbra, 2001; 2002a,b).

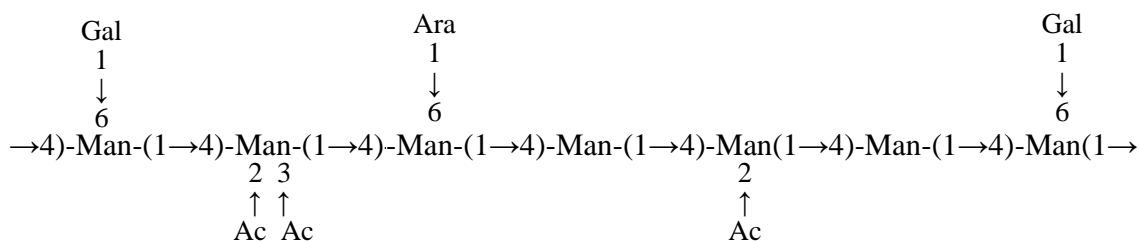


Figura 1.1. Representação esquemática da estrutura das galactomananas das infusões de café torrado.

A análise por RMN de ^1H e ^{13}C (Navarini *et al.*, 1999) e a análise por metilação (Nunes e Coimbra, 2001) mostram que, num café torrado, as galactomananas são

polímeros acetilados que têm na cadeia principal resíduos de D-manose ligadas por ligação β -(1 \rightarrow 4), com cadeias laterais em C6 de resíduos únicos de α -D-galactose (**Figura 1.1.**).

1.2. Espectrometria de massa na caracterização de oligossacarídeos

A complexidade dos polissacarídeos torna a sua caracterização muito difícil. Esta requer a aplicação de métodos combinados de diferentes técnicas, de modo à obtenção detalhada de informação estrutural primária dos polissacarídeos. Estas técnicas podem passar por técnicas de espectrometria de massa, como a ionização por desorção por laser assistida por matriz (MALDI) e a ionização por electrospray (ESI). Por vezes estas técnicas estão associadas a métodos de separação prévios tais como cromatografia de exclusão molecular e cromatografia de troca iónica. Esta associação é muito vantajosa na análise de misturas complexas. A espectrometria de massa é uma ferramenta importante na análise estrutural de polissacarídeos pois oferece resultados precisos, versatilidade analítica e elevada sensibilidade, característica esta muito importante considerando que as amostras são obtidas por extracção de fontes naturais, muitas vezes implicando uma quantidade limitada de amostra obtida.

O ESI, tal como o MALDI, é um método de ionização suave devido à quantidade de energia depositada na amostra durante o processo de ionização, permitindo a observação do ião molecular no espectro de massa e ausência de iões-fragmento (Zaia, 2004 e Harvey, 2006). Os espectros de ESI-MS e MALDI-MS resultantes são de simples e de fácil interpretação e, por este motivo, os métodos de ionização por ESI e MALDI têm sido aplicados na análise de misturas de biopolímeros e, mais especificamente, na análise de misturas de oligossacarídeos (Zaia, 2004 e Harvey, 2006). O estudo dos espectros de massa permite a identificação da massa molecular dos oligossacarídeos que, quando combinada com a composição em açúcares, permite propor uma série de estruturas prováveis. A certeza destas estruturas só é conseguida por Espectrometria de Massa Tandem (MS/MS). A caracterização de oligossacarídeos por MS é realizada, então, através não só da determinação da massa molecular (espectros de ESI-MS e MALDI-MS), mas também através da fragmentação do oligossacarídeo (MS/MS). A identificação dos iões

fragmento no espectro de MS/MS permite obter informação sobre a composição em monossacarídeos, informação quanto ao padrão de ramificação (Harvey *et al.*, 1997) e em alguns casos quanto ao tipo de ligações presentes na estrutura (Bahr *et al.*, 1997; Harvey, 2000)

Existem diversos trabalhos publicados sobre a caracterização estrutural de oligossacarídeos por MALDI-MS/MS e ESI-MS/MS. No entanto a grande maioria destes trabalhos tem como objectivo a análise de oligossacarídeos, de glicoproteínas ou mesmo compostos modelo com estrutura semelhante a estes. (Zaia, 2004 e Harvey, 2006).

Alguns exemplos de estudos de análise de oligossacarídeos com a aplicação de espectrometria de massa com ESI são: o estudo de xilo-oligossacarídeos, de arabinogalactanas, de arabinoxilanas, de galactomananas, etc. No caso do estudo de xilo-oligossacarídeos a técnica de ESI-MS/MS permitiu por exemplo a identificação estrutural destes, neutros e ácidos, da madeira e da azeitona (Reis *et al.*, 2002; Reis *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 2004a), permitindo a diferenciação de oligossacarídeos de xilose com a mesma massa molecular, obtidos de fontes diferentes, que por existirem em misturas em muito pequena quantidade seriam praticamente impossíveis de separar, analisar e diferenciar por outros métodos (Reis *et al.*, 2004b). Arabinogalactanas de substâncias pécicas da soja (Huisman *et al.*, 2001) e arabinoxilanas extraídas do milho (Fernández *et al.*, 2003) foram caracterizadas estruturalmente também com sucesso usando ESI-MS/MS.

Estudos recentes reportam também a identificação estrutural por ESI-MS/MS de galactomananas presentes na bebida do café (Nunes *et al.*, 2005), onde se descreveu a estrutura detalhada destas e se identificou pela primeira vez que as mananas do grão de café verde e torrado são acetiladas. O ESI-MS/MS permitiu também a identificação de detalhes estruturais de mananas do café decorrentes do processo de torra, nomeadamente compostos, presentes no terminal redutor da mananas, que resultam de reacções de caramelização, reacções de Maillard, oxidações e reacções de descarboxilação (Nunes *et al.*, 2006).

1.3. Efeito imunomodulador dos polissacarídeos das plantas

Nos últimos anos, os polissacarídeos de plantas têm vindo a revelar-se como uma importante classe de produtos naturais bioactivos. Uma vasta gama de polissacarídeos exhibe actividade imunológica, antitumoral (Stimple *et al.*, 1984), imunoestimulatória (Silva e Wood, 2000), anticomplementar (Yamada, 1994), anti-inflamatória, anticoagulante e fibrinogénica (Hussein *et al.*, 1998).

A substância bioactiva encontrada na planta de *Aloe vera* é uma manana acetilada (acemanana, referida também com o nome comercial de “Carrysin”). Tal como a manana do café, a acemanana é um polissacarídeo com uma cadeia principal constituída por resíduos de manose em ligação β -(1 \rightarrow 4) e que se encontram acetilados. Este polissacarídeo possui também glucose na sua cadeia principal (glucomanana) e as cadeias laterais são formadas por unidades de galactose e por pequenas quantidades de outros açúcares como ácido galacturónico, arabinose, fucose e xilose. A distribuição dos grupos acetilo e das unidades de galactosilo e outros substituintes ao longo da cadeia podem ter efeito significativo nas propriedades biológicas atribuídas ao polímero bioactivo (Femenia *et al.*, 2003).

As acemananas são conhecidas por terem diversas actividades imunomodulatórias *in vitro* e *in vivo*. Através da activação de respostas imunitárias elas são responsáveis por terem actividade antiviral e antitumoral (Lee *et al.*, 2001). Estas actuam como imunoestimulantes, mostrando actividade específica na produção de anticorpos. A sua acção está também associada à activação de macrófagos e à estimulação de células linfocitárias T (Chow *et al.*, 2005).

Os linfócitos são as principais células do sistema linfático, e em conjunto com os macrófagos e os neutrófilos, constituem os glóbulos brancos. Os linfócitos são produzidos e sofrem maturação em órgãos específicos, denominados de órgãos linfóides primários que em ratinhos e humanos são a medula óssea e o timo. Os órgãos linfóides secundários são o baço, as placas de peyer no intestino e as amígdalas (Abba *et al.*, 2000). Para além destas células, o sistema imunitário inclui outras substâncias solúveis, que actuam como mensageiros para activar outras células, entre as quais os anticorpos, as proteínas e as citocinas (<http://www.manualmerck.net>).

A maioria dos linfócitos divide-se em três categorias principais: linfócitos B, linfócitos T e células NK (“natural killer”). Os linfócitos B derivam de uma célula da medula óssea (célula mãe ou precursora) e amadurecem até se converterem em células plasmáticas, que segregam anticorpos (<http://www.manualmerck.net>). Os anticorpos são glicoproteínas excretadas pelos linfócitos B que têm a capacidade de reconhecer especificamente qualquer tipo de molécula. A imunidade mediada por este tipo de células B é importante no combate a infecções por patógenos extracelulares (Abba *et al.*, 2000). Os linfócitos T formam-se quando as células mãe ou precursoras migram da medula óssea para o timo, uma glândula onde se dividem e amadurecem. No timo, os linfócitos T conseguem distinguir o próprio corpo do corpo estranho. Os linfócitos T maduros abandonam o timo e entram no sistema linfático, onde funcionam como parte do sistema imunitário de vigilância (<http://www.manualmerck.net>). Os linfócitos T, que se dividem em dois subgrupos, os linfócitos T-citotóxicos (TCD8⁺) e os linfócitos T-reguladores (TCD4⁺). Os linfócitos TCD8⁺ são células que possuem actividade citolítica e são importantes na eliminação de células infectadas por vírus. Os linfócitos TCD4⁺ são células importantes na regulação da acção de outros linfócitos, sendo capazes de inibir ou activar quer os linfócitos B, quer os linfócitos T-citotóxicos (Abba *et al.*, 2000).

Quando uma célula linfocitária é activada, esta poderá proliferar e diferenciar-se numa célula efectora, no caso de linfócitos B, capazes de secretar anticorpos, e no caso de linfócitos TCD8⁺, adquirindo actividade citolítica capaz de promover apoptose da célula alvo. As células T-reguladoras, após activação, vão proliferar e tornar-se efectoras. Neste caso das T-reguladoras, a função efectora é a produção de moléculas, entre elas moléculas secretadas- citocinas (Abbas *et al.*, 2000). As citocinas são segregadas por células do sistema imunitário em resposta a uma estimulação e comportam-se como os mensageiros do sistema imunitário. (<http://www.manualmerck.net>). Estas não intervêm directamente na lise ou na eliminação do patógeno, a sua função é “ajudar” as outras células a fazê-lo (Abbas *et al.*, 2000). Foram identificadas já muitas citocinas, no entanto a lista continua a crescer (<http://www.manualmerck.net>). Um exemplo de citocina é a IL10. Esta é uma citocina anti-inflamatória, associada a efeitos imunossupressores (Abbas *et al.*, 2000).

Os macrófagos são glóbulos brancos grandes que se encontram bem distribuídos pelo organismo e possuem características diferentes dos linfócitos. Entre elas, possuem a capacidade de iniciar de imediato uma resposta após activação por um microorganismo. A

função destas células é fagocitar e eliminar patogénicos (Abbas *et al.*, 2000). Os macrófagos produzem espécies reactivas de oxigénio, entre eles o óxido nítrico, por isso, a produção deste é uma medida da activação dos macrófagos (Abbas *et al.*, 2000).

As respostas imunes dos macrófagos fazem parte da imunidade inata, de menor especificidade que a imunidade adquirida, onde se inserem os linfócitos. Este tipo de resposta desencadeada pelos linfócitos, ao contrário da desencadeada pelos macrófagos, promove a memória imunológica, importante característica do sistema imune pois aquando a primeira infecção de determinadas doenças o sistema imune adquire a capacidade de responder mais rápida e intensamente a novas infecções por esse mesmo microorganismo (Abbas *et al.*, 2000).

A rede complexa de procedimentos do sistema imunitário pode dividir-se em duas categorias, a imunidade inata e a adquirida. Todas as pessoas nascem com imunidade inata. Nesta imunidade inata participam alguns componentes do sistema imunitário tais como os macrófagos, neutrófilos e sistema do complemento. Estes componentes do sistema imunitário reagem de forma semelhante perante todas as substâncias estranhas, e o reconhecimento dos antígenos não varia de pessoa para pessoa (<http://www.manualmerck.net>).

Como o seu nome indica, a imunidade adquirida é adquirida. Na altura do nascimento, o sistema imunitário de uma pessoa ainda não foi confrontado com o mundo exterior nem começou ainda a desenvolver os seus arquivos de memória. À medida que o sistema imunitário se confronta com novos antígenos vai aprendendo a responder. A imunidade adquirida é específica dos antígenos que a pessoa encontra ao longo da sua vida. Estas duas imunidades, inata e adquirida não são independentes uma da outra (<http://www.manualmerck.net>).

Tem crescido a procura de agentes capazes de promover a activação da imunidade, quer a adquirida quer a inata, com importância relevante em casos de deficiente resposta do sistema imunitário, como é o caso de doentes com SIDA e com cancro (Turowski e Triozzi, 1994), com outras infecções virais ou outras patologias, o que justifica a crescente investigação nesta área.

Apesar da actividade biológica de polissacarídeos ser conhecida há 30 anos, a falta de informação estrutural e mecanística definida limita o estudo destes como potencial uso clínico (Tzianabos, 2000). Existem apenas alguns estudos de estrutura-actividade de

polissacarídeos. Alguns exemplos destes estudos são a relação entre as características estruturais e a função biológica de polissacarídeos de *B. fragilis*, de β -(1-3) glucanas de fungos e leveduras, de mananas da *Candida albicans* e de proteínas ligadas a polissacarídeos de cogumelos (Tzianabos, 2000). Torna-se assim cada vez mais importante conhecer em detalhe a estrutura dos compostos bioactivos para melhor compreender a sua função.

1.4 Enquadramento e Objectivos do trabalho

Atendendo à abundância das mananas no café (Nunes *et al.*, 2005), e à semelhança estrutural entre as mananas do café e as mananas do *Aloe vera*, torna-se relevante estudá-las como fonte de materiais bioactivos com actividades semelhantes às descritas para a acemanana do *Aloe vera*.

Como o volume diário de resíduo de café é enorme, têm sido propostas várias soluções para o seu reaproveitamento, nomeadamente, a utilização como fertilizante, combustível (Silva *et al.*, 1998), ou como fonte de materiais antioxidantes (Yen *et al.*, 2005). Com este trabalho propõe-se também o estudo que leve à utilização do resíduo de café como fonte de polissacarídeos com actividade imunomoduladora e consequente reaproveitamento deste subproduto.

Objectivos do trabalho:

Objectivo geral:

Tendo em conta que as mananas do café são estruturalmente semelhantes às mananas bioactivas do *Aloe vera*, neste trabalho propõe-se o isolamento, caracterização estrutural e investigação do potencial efeito imunomodulador das mananas do resíduo de café.

Objectivos específicos:

1. Isolamento, purificação e caracterização das mananas do resíduo de café.
2. Preparação e caracterização estrutural de mananas acetiladas a partir da manana do resíduo de café.
3. Investigação do potencial efeito imunomodulador das mananas do resíduo de café derivatizadas por acetilação e das mananas nativas das infusões de café.

CAPÍTULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Identificação das amostras de mananas estudadas

As amostras de mananas do resíduo de café, utilizadas como objecto de estudo deste trabalho, foram preparadas a partir do resíduo de café expresso fornecido por comerciantes locais e obtido a partir de lotes comerciais de origem identificada. As mananas foram obtidas por extracção sequencial do resíduo de café com vários solventes (procedimento sumariado na **Figura 2.1.**) e derivatização por acetilação como forma de solubilização em soluções aquosas. A caracterização destas amostras foi um dos objectos de estudo deste trabalho.

Para comparação com as amostras de resíduo de café, uma vez que se pretendia investigar o seu potencial efeito imunomodulador, foram testadas duas fracções de *Aloe vera* comercial. Estas duas fracções foram obtidas previamente a partir de um comprimido de extracto de *Aloe vera* (Healthspan, UK), designada por AV1, e a partir de uma cápsula de extracto de *Aloe vera* (Molo-Cure, USA), designada por AV2. A fracção AV1, possuía 85% de polissacarídeos, constituídos maioritariamente por resíduos de glucose (94,4%), alguns resíduos de arabinose (2,2%), xilose (1,6%), manose (1,1%) e fucose (0,8%) (**Tabela 2.1.**). Esta amostra é, por isso, maioritariamente rica em glucanas. A fracção AV2 continha 34% de polissacarídeos, constituídos maioritariamente por resíduos de manose (41,3%) e glucose (41,3%), alguns resíduos de xilose (2,7%), galactose (4,7%), arabinose (4,0%) e fucose (2,7%) (**Tabela 2.1.**). AV2 é uma fracção contendo uma mistura de vários polissacarídeos ricos em manose. AV2 é um extracto menos rico em polissacarídeos que AV1 mas rico em mananas.

Tabela 2.1. Composição em açúcares das amostras de extractos de *Aloe vera*, AV1 e AV2 (Filipe T. Gil e M. A. Coimbra (resultados não publicados)).

Extracto de <i>Aloe vera</i>	Composição em açúcares (% mol)						% Açúcares na amostra
	Fuc	Xyl	Ara	Man	Gal	Glc	
AV1 (Healthspan, UK)	0,8	1,6	2,2	1,1	0	94,4	86,5
AV2 (Molo-Cure, USA)	2,7	6,7	4,0	41,3	4,7	41,3	34,1

Como objecto de estudo do potencial efeito imunomodulador de mananas de café, foram também utilizadas mananas previamente purificadas a partir de infusões de café Arábica com dois graus de torra, 5 % e 10 % de percentagem de perda de peso em relação à massa seca de café verde (Nunes *et al.*, 2006a), que serão designadas por IC5 e IC10, respectivamente. Estas fracções foram obtidas a partir das infusões de café, após fraccionamento em soluções de etanol, cromatografia de troca iónica e cromatografia de afinidade ao ácido fenilborónico, tal como descrito por Nunes *et al.* (2006a). Estas fracções foram previamente caracterizadas por Nunes *et al.* (2006a), apresentando-se na **Tabela 2.2.** os resultados já publicados relativos à composição em açúcares em % molar das amostras IC5 e IC10, purificadas

Tabela 2.2. Composição em açúcares das fracções ricas em mananas obtidas a partir das infusões de café que foram utilizadas neste estudo, IC5 e IC10.

Amostra	Composição em açúcares (% mol)					% Açúcares na amostra
	Rha	Ara	Man	Gal	Glc	
Grau de torra 5% torra (IC5)	0	2	89	7	1	76,3
Grau de torra 10% (IC10)	0	1	92	5	1	63,4

2.2. Determinação da percentagem de humidade do resíduo de café

A percentagem de humidade do resíduo de café foi determinada por diferença de massas. Pesou-se rigorosamente numa cápsula seca cerca de 10 g de resíduo de café. Esta foi aquecida numa estufa a 80 °C durante 24 horas. Após este período, a cápsula foi arrefecida num exsiccador e a sua massa foi determinada. Este procedimento foi realizado várias vezes (estufa a 80 °C; 6 horas; arrefecimento; determinação da massa) até à ausência de variação de massa entre pesagens. A diferença entre a massa inicial e a massa final do resíduo de café corresponde à humidade da amostra.

2.3. Isolamento e preparação dos extractos de alto peso molecular do resíduo de café

Os polissacarídeos do resíduo de café foram extraídos por extracção sequencial com: (1) água destilada a 90 °C, durante 2 h, 2 L de solução; (2) 0,5 M imidazol/ HCl (pH 7,0), 2 L de solução durante 1 h a 70 °C; (3) 0,05 M NaOH + 0,02 M NaBH₄, 1 L de solução durante 2 h a 25 °C e sob atmosfera de azoto; (4) 1 M NaOH + 0,02 M NaBH₄, 1 L de solução durante 2 h a 25 °C e sob atmosfera de azoto; (5) 4 M NaOH + 0,02 M NaBH₄, 1 L de solução durante 2 h a 25 °C e sob atmosfera de azoto (**Figura 2.1.**).

O imidazol foi utilizado pois é um agente quelante e devido às paredes celulares das plantas possuírem pontes de cálcio, o imidazol destrói estas estruturas facilitando a remoção dos polissacarídeos.

As soluções de NaOH quebram as pontes de hidrogénio das cadeias dos polímeros, promovendo a ruptura destas, solubilizando assim os polímeros existentes no resíduo de café.

As extracções com NaOH foram efectuadas com soluções desprovidas de oxigénio, por preparação com água quente destilada fervida durante 30 min e arrefecida sob corrente de azoto. As soluções alcalinas foram preparadas imediatamente antes de cada extracção que decorreram sempre sob corrente constante de azoto de forma a garantir a ausência de oxigénio.

Depois de cada extracção com água, imidazol e NaOH, os polímeros solubilizados foram separados do resíduo insolúvel por centrifugação (15000 rpm, durante 10 min, a 4 °C) seguida de uma filtração do sobrenadante, através de um filtro de fibra de vidro (Whatman GF/C). Os extractos de NaOH foram acidificados a pH 5 com ácido acético glacial antes da diálise.

Todos os extractos foram dialisados (limite de exclusão médio das membranas de diálise: 12000-14000 Da) a 4 °C durante pelo menos 4 dias e pelo menos 8 mudas de água, com adição de algumas gotas de clorofórmio e tolueno para evitar o crescimento microbológico. Através da diálise foram eliminadas todas as moléculas de baixo peso molecular. Depois da diálise e concentração a pressão reduzida dos extractos de NaOH separaram-se por centrifugação o extracto insolúvel (Precipitado NaOH), formado durante a diálise, e o extracto solúvel (Sobrenadante NaOH).

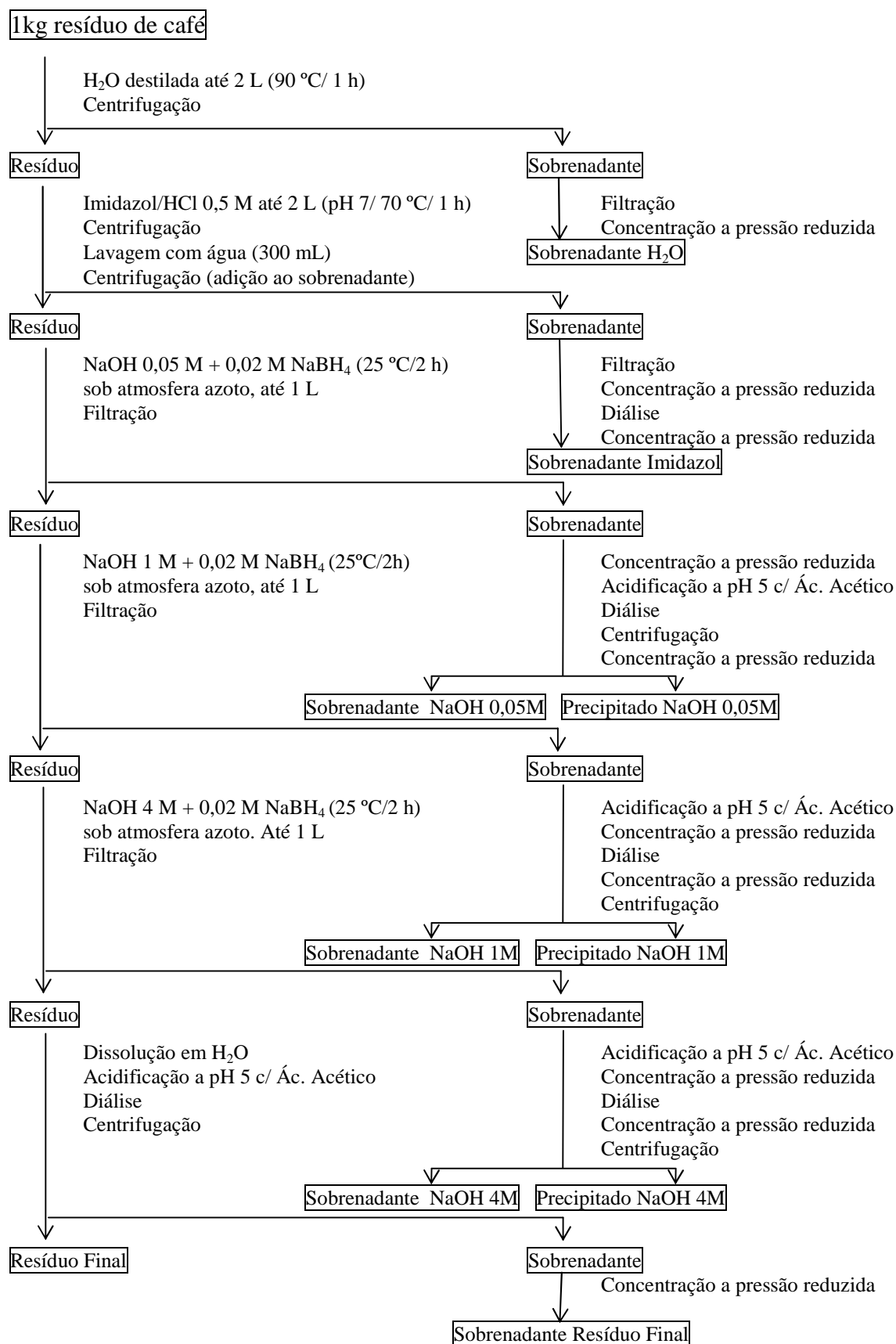


Figura 2.1. Extração sequencial dos polissacarídeos do resíduo de café com água quente, imidazol e soluções alcalinas.

O resíduo que se mantém após as extracções alcalinas foi suspenso em água destilada, acidificado (pH 5) e dialisado. O extracto solúvel obtido depois da diálise (Sobrenadante Resíduo Final) foi recolhido separadamente por centrifugação. Depois da diálise todos os extractos foram concentrados a pressão reduzida, a uma temperatura compreendida entre 30 e 40 °C, de forma a evitar reacções que pudessem degradar ou alterar a estrutura dos polissacarídeos, foram congelados e liofilizados.

2.4. Análise de Açúcares por GC-FID

A análise de açúcares dos extractos obtidos da extracção sequencial do resíduo de café foi feita por derivatização dos açúcares a acetatos de alditol após hidrólise ácida por adaptação do método proposto por Coimbra *et al.* (1996). Os açúcares neutros foram libertados dos polissacarídeos por hidrólise de Saeman. Pesou-se rigorosamente 2-3 mg de amostra para tubos de cultura. Foram adicionados 200 µL de H₂SO₄ a 72 %, tendo-se deixado reagir durante 3 h à temperatura ambiente. No final, a amostra foi diluída com 2,2 mL de água destilada, e esta foi agitada e incubada a 100 °C, durante 2,5 h para que ocorresse a hidrólise.

Após arrefecimento foram adicionados 200 µL de padrão interno, 2-desoxiglucose (1 mg/mL). A 1 mL desta solução foram adicionados 200 µL de NH₃ 25 % para neutralização do ácido que fica em solução, e 100 µL de uma solução contendo 15 % de NaBH₄ em NH₃ 3 M (preparada na hora) para redução dos açúcares a alditois. A solução foi agitada e incubada durante 1 h a 30 °C. Após este período o tubo foi arrefecido em gelo e o NaBH₄ em excesso foi eliminado com duas adições de 50 µL de ácido acético glacial.

A derivatização dos alditois a acetatos de alditol foi realizada por um método adaptado do descrito por Blakeney *et al.* (1983).

A 300 µL da solução de alditois arrefecida em gelo foram adicionados 450 µL de 1-metilimidazol (usado como catalisador) e 3 mL de anidrido acético, tendo-se deixado a reagir durante 30 min a 30 °C. O anidrido acético vai transformar os alditois em acetatos de alditol e a incubação a 30 °C vai favorecer esta transformação.

O anidrido acético em excesso foi destruído por adição de 4,5 mL de água e os acetatos de alditol foram extraídos por adição de 3 mL de diclorometano. Após agitação e centrifugação a baixa velocidade, durante 1 min, para a separação de fases, a camada superior aquosa foi aspirada. Foram adicionados mais 2 mL de diclorometano e a fase orgânica foi lavada 3 vezes com 3 mL de água com o objectivo de remover completamente o 1-metilimidazol (Hoebler *et al.*, 1989).

A fase orgânica foi transferida para um novo tubo, sendo o diclorometano evaporado a pressão reduzida num concentrador de amostras (speed vacuum). Os resíduos de água foram eliminados por co-evaporação com acetona aquando de 2 ou 3 lavagens com 1 mL de acetona anidra seguida de secagem. No final, a amostra foi dissolvida em 50 µL de acetona anidra.

Os acetatos de alditol (injecção de 2 µL) foram separados por cromatografia em fase gasosa (GC), Carlo Erba 6000 com detector de ionização de chama (FID), utilizando uma coluna polar intermédia (DB-225) capilar (0,25 mm) com um comprimento de 30m e espessura de filme 0,15 µm, com velocidade do gás de arraste (H₂) de 1 mL/min. O programa de temperaturas do forno utilizado foi: temperatura inicial de 200 °C, aumento de temperatura de 40 °C/min até 220 °C, a 220 °C durante 14 min seguindo-se de um aumento de 20 °C/min até os 230 °C, mantendo esta temperatura por 1 min. A temperatura do injector e do detector foi de 220 e 230 °C respectivamente.

A quantificação dos acetatos de alditol nas amostras foi obtida pela técnica do padrão interno. As amostras foram analisadas em duplicado.

2.5. Acetilação do extracto rico em mananas do resíduo de café

Conforme descrito no esquema da **figura 2.2.**, a 1 g de extracto de precipitado formado durante a diálise a 4 °C do material proveniente da extracção com solução de NaOH 4 M (Precipitado NaOH 4 M) foram adicionados 2 mL de anidrido acético e 50 mg de iodo (catalisador). Após agitação, deixou-se a suspensão reagir a 100 °C durante 10 min. Depois de arrefecer à temperatura ambiente, adicionou-se 2 mL de solução saturada de tiosulfato de sódio para eliminar o iodo em excesso. A suspensão foi adicionada lentamente a 50 mL de etanol e deixou-se em agitação 30 min. Por centrifugação (15000

rpm, 10 min, 4 °C) separou-se o precipitado da fracção solúvel em etanol e o precipitado foi suspenso em água durante algumas horas, com agitação, de forma a garantir que a fracção de polissacarídeos solúveis em água (acetilados) passassem para a solução (Biswas *et al.*, 2005). O “Material insolúvel” foi removido novamente por centrifugação (15000 rpm, 10 min, 4 °C) e o sobrenadante foi denominado “Material solúvel”. Estas fracções foram dialisadas a 4 °C durante pelo menos 4 dias e pelo menos 8 mudas de água, com adição de algumas gotas de clorofórmio e tolueno para evitar o crescimento microbológico.

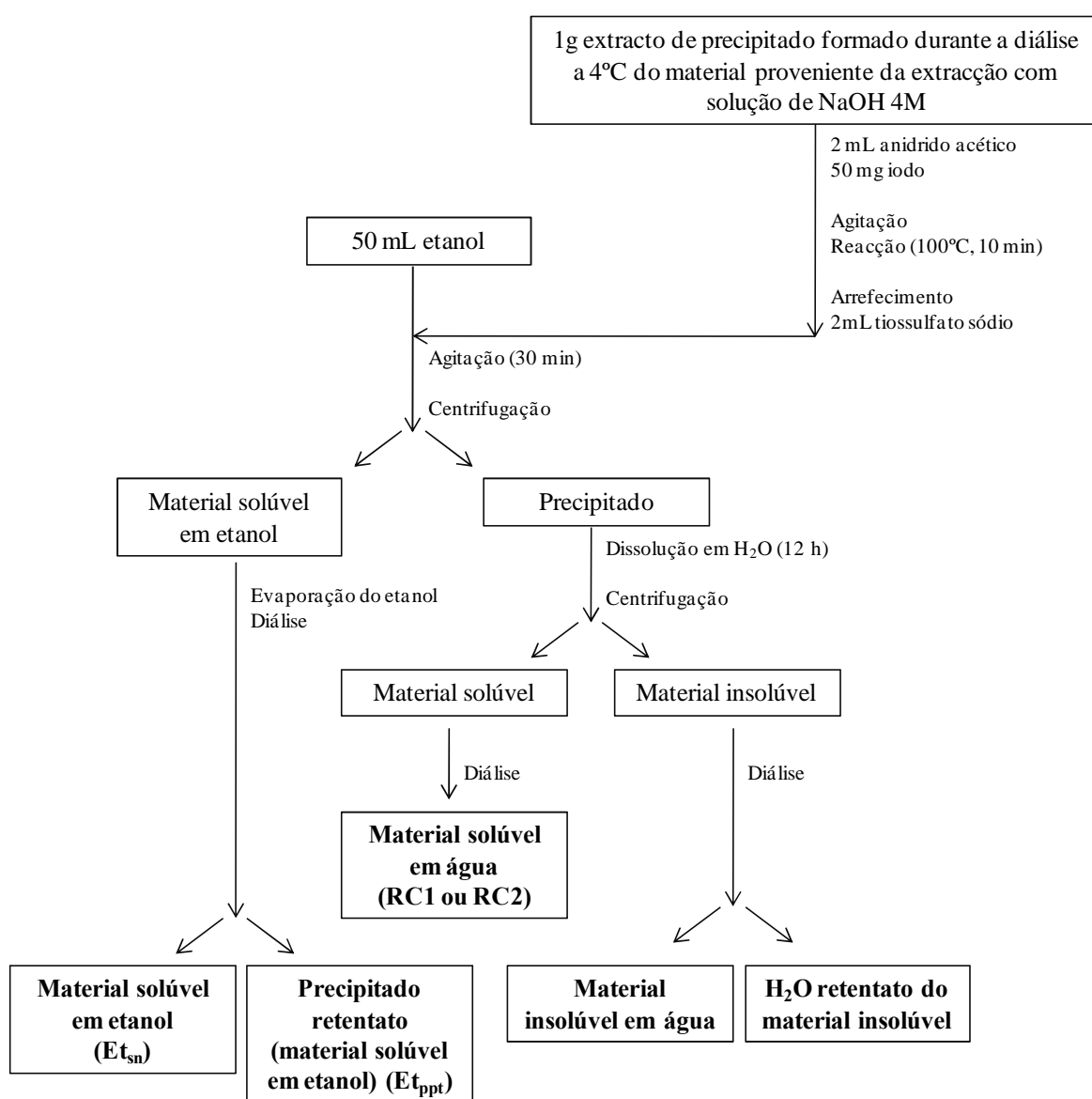


Figura 2.2. Procedimento de acetilação de mananas do resíduo de café

Da diálise do material insolúvel obteve-se mais uma fracção, a água do retentato deste. Para ter a certeza de que na fracção solúvel em etanol não era removida uma quantidade importante de material, após evaporação do etanol, foi feita uma diálise, obtendo-se uma fracção constituída pelo precipitado que se formou no retentato aquando da diálise e outra que constituía o sobrenadante.. As 5 fracções obtidas: “Material solúvel em etanol”, “Precipitado retentato (material solúvel em etanol)”, “Material insolúvel”, “H₂O retentato do material insolúvel” e “Material solúvel” (RC1 e RC2) foram congeladas e liofilizadas.

De forma a tentar otimizar o procedimento de acetilação foram ainda realizados dois ensaios em que, para 1 g de amostra, foram adicionados 4 mL de anidrido acético e 50 mg de iodo, originando o material solúvel RC3.

2.6. Determinação do grau de acetilação das mananas acetiladas

O grau de acetilação foi determinado por quantificação do ácido acético obtido por saponificação dos grupos acetilo, acidificação da solução, microextracção em fase sólida (SPME) no modo de espaço de cabeça e análise por cromatografia em fase gasosa, de acordo com a metodologia descrita por Nunes *et al.* (2006b). Para a elaboração da curva de calibração foram preparadas soluções padrão de ácido acético com concentração entre 50 e 130 mg/L a partir de uma solução de ácido acético a 99,5 %. Foi seleccionada esta gama de concentrações por ser próxima da esperada encontrar nas amostras de mananas. Uma relação linear entre a concentração de ácido acético e a área dos picos de GC permite obter o grau de acetilação. O grau de acetilação corresponde à razão entre a quantidade, em moles, de ácido acético e de resíduo de açúcar na fracção.

Num frasco de SPME de 10 mL pesou-se 2-3 mg de amostra e adicionou-se 2,4 mL de água destilada. A solução foi colocada no banho de ultra-sons durante 10 min de forma a ajudar à solubilização. Adicionou-se depois 0,8 mL de NaOH 2 M e deixou-se reagir a 25 °C durante 1h. A solução com a amostra saponificada foi de seguida a solução foi acidificada (pH 2) com 0,8 mL de HCl 2M. Colocou-se a amostra num banho a 40 °C

durante 10 min, seguindo-se a exposição da fibra de SPME no espaço de cabeça durante 30 min e análise por GC.

Foi usada uma fibra revestida de 50/30 μm de divinilbenzeno/carboxeno em polidimetilsiloxano (DVB/Carboxeno/PDMS) previamente acondicionada a 250 °C durante 1h.

2.7. Hidrólise e caracterização estrutural por ESI-MS e MS/MS de mananas acetiladas do resíduo de café

2.7.1. Hidrólise enzimática

A hidrólise específica das mananas acetiladas do resíduo de café (RC1) foi realizada por hidrólise enzimática com uma *endo*- β -(1 \rightarrow 4)-D-mananase de *Aspergillus niger* (EC 3.2.1.78, Megazyme, Irlanda). A hidrólise foi realizada por adição de 1 U de enzima a 15 mg de amostra em 5 mL de tampão de acetato de sódio 100 mM pH 5,5 contendo 0,02 % de azida de sódio. A hidrólise foi realizada a 37 °C durante 48 h com agitação. Após hidrólise o material foi congelado e liofilizado.

2.7.2. Cromatografia de exclusão molecular- Biogel P2

A cromatografia de exclusão molecular em Biogel P2 foi realizada numa coluna XK 16/100 (Pharmacia) com diâmetro de 1,6 cm e altura de fase estacionária de 53 cm. A coluna foi empacotada de acordo com as instruções do fabricante. O eluente utilizado foi água e o fluxo do eluente através da coluna foi de 0,25 mL/min. O material aplicado foi dissolvido no volume máximo de 1,5 mL e aplicado no topo da coluna através de uma bomba peristáltica. Foram recolhidas fracções de 1,0 mL e a detecção dos oligossacarídeos foi realizada usando um detector ELSD (“evaporative light scattering detection”). A detecção por ELSD nas várias fracções de recolha foi possível mediante a introdução de 70 μL de volume de recolha com um fluxo de 4 mL/min para o interior do detector a uma

temperatura de 57 °C e pressão a 1,9 bar por meio de uma bomba peristáltica. A detecção por UV foi realizada por leituras da absorvância no comprimento de onda de 280 nm.

A coluna foi calibrada para monossacarídeos, dissacarídeos e tetrassacarídeos. e volume de exclusão molecular pela utilização de glucose, celobiose e staquiose e dextrana azul, respectivamente.

As fracções recolhidas foram evaporadas à secura na “Speed Vacuum”.

2.7.3. Espectrometria de massa com ionização por Electrospray (ESI-MS e MS/MS)

Fracções representativas, obtidas da amostra RC1 por hidrólise enzimática com a *endo*- β -(1 \rightarrow 4)-D-mananase e após fraccionamento por exclusão molecular, foram seleccionadas para análise por espectrometria de massa. Os resíduos secos foram dissolvidos em água miliQ e 4-6 μ L desta solução foram diluídos em 200 μ L de uma solução 50:49:1, v/v/v, de água:metanol:ácido fórmico. As amostras foram introduzidas num espectrómetro de massa trapa de iões LXQ, do inglês “Ion Trap” (Thermo Finningan, San Jose), com fonte de ionização de electrospray operando em modo positivo, utilizando um fluxo de 5 μ L/min. Os espectros de ESI-MS e ESI-MS/MS foram adquiridos utilizando uma voltagem de 5,5 kV. Foi utilizado azoto como gás nebulizador e gás de secagem. Os espectros de MS/MS foram obtidos variando a energia de colisão entre 15 e 25 (unidades arbitrárias).

2.8. Investigação do potencial efeito imunomodulador das mananas

De modo a investigar o potencial efeito imunomodulador dos polissacarídeos em estudo, foram realizados no ICBAS- Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, com a supervisão do Prof. Doutor Manuel Vilanova, ensaios de avaliação da activação e proliferação de linfócitos B e T, da produção de IL-10 e da produção de óxido nítrico por macrófagos, de acordo com as metodologias descritas por

Dourado *et al.* (2004). Foram realizadas 2- 6 réplicas por tipo de ensaio diferente realizado.

2.8.1. Remoção de lipopolissacarídeos das amostras

Previamente a todos os ensaios de imunomodulação, as amostras a testar foram passadas por uma coluna de afinidade de Polimixina B para a remoção de lipopolissacarídeos (LPS). A ausência de LPS foi confirmada através do teste lisado do amebocito *Limulus* (E-toxate, Sigma).

2.8.2. Ensaios de activação de linfócitos B e T

Os tipos de células linfocitárias estudadas foram os linfócitos B e os linfócitos T, especificamente as células TCD8⁺ (T- citotóxicas) e TCD4⁺ (T- reguladoras).

Todas as fracções obtidas, conforme descrito no capítulo 2.1., foram testadas para a sua capacidade de induzir *in vitro* a expressão do marcador precoce de activação CD69 nos linfócitos B e T de ratinhos.

Para o efeito, foi preparada uma suspensão de células esplénicas de ratinhos C57BL/6 através da homogeneização do baço dos ratinhos em meio RPMI, suplementado com penicilina (100 IU/mL), estreptomicina (50 µg/mL), 2-mercaptoetanol (0,05 M) e 10 % de soro fetal bovino (RPMI). As células foram então distribuídas em placas de cultura de 96 poços (10⁶ células/poço) e cultivadas durante 6 h numa estufa a 37 °C numa atmosfera humidificada e com 5% de CO₂. As células plaqueadas foram estimuladas com RPMI (controlo negativo), LPS (5 µg/mL, controlo positivo) e com as amostras a testar em diferentes concentrações (entre 6 e 100 µg/mL).

Ao fim do tempo pretendido as células foram incubadas durante 30 min com os anticorpos específicos. De acordo com a população linfocitária a estudar foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD8 e anti-B220 para marcar, respectivamente, as células T- reguladoras, T- citotóxicas e B. Para avaliar a activação das células usou-se o anticorpo anti-CD69, uma marcador precoce de activação. Por fim, adicionou-se tampão

PBS (pH 7,5) diluído contendo azida de sódio e BSA, de forma a retirar o excesso de anticorpo. Centrifugou-se e ressuspenderam-se as células em tampão de PBS/BSA/azida contendo iodeto de propídio de modo a identificar e excluir as células mortas. Por fim, as células foram analisadas por citometria de fluxo.

A citometria envolve a análise quantitativa de parâmetros celulares. O citómetro de fluxo é um aparelho de análise multiparamétrica de partículas (uma a uma) em suspensão. Neste aparelho faz-se passar, por um feixe de luz (laser), partículas em suspensão, de uma forma alinhada. A interacção destas com o feixe gera sinais, que podem ser gerados pela dispersão do feixe de luz ou pela luz emitida por fluorocromos após excitação pelo feixe de luz, sinais estes que são captados por detectores apropriados e a informação produzida.

Assim, por este processo, é possível seleccionar populações linfocitárias e verificar se cada linfócito está ou não activado, através de anticorpos específicos utilizados, acoplado a um corante fluorescente (anti-CD69⁺, anti-CD4⁺, anti-CD8⁺, etc), que são depois detectados por foto-sensores, que recebem o comprimento de onda seleccionado. Existem dois tipos de foto-sensores, o foto-sensor de Dispersão Frontal (FS) e o foto-sensor de Dispersão Lateral (SS). O FS capta a intensidade da dispersão frontal e esta é proporcional ao tamanho e forma das partículas. O SS capta a intensidade e luz dispersa a 90° e esta é proporcional ao tamanho, granularidade e forma das partículas. O processamento electrónico do sinal gerado nos sensores é por fim traduzido num histograma ou scatter plot (citograma).

2.8.3. Ensaaios de proliferação

De forma a avaliar a capacidade dos polissacarídeos de induzir a proliferação de linfócitos do baço, efectuou-se o ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). O MTT é um reagente que é clivado por enzimas mitocondriais e que vão formar um precipitado com absorvância a 570 nm. Quanto maior for o número de células, maior será a absorvância medida.

Foram feitas culturas de células do baço de ratinhos, estimuladas com RPMI (controlo negativo), LPS (controlo positivo), Concanavalina A (controlo positivo) e com as diferentes amostras em diferentes concentrações. Estas foram incubadas durante 4 dias a

37 °C em atmosfera humidificada e com 5% de CO₂. Posteriormente, foi adicionada solução de MTT aos poços e a placa foi incubada durante 4 h. O precipitado formado foi dissolvido numa solução de HCl 1M em isopropanol e a absorvância foi medida a 570 nm.

2.8.3.1. Avaliação da produção de IL-10

A capacidade das amostras induzirem a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, foi avaliada por citometria de fluxo após a marcação intra-citoplasmática dos linfócitos do baço de ratinhos.

Foi feita uma suspensão de células esplénicas de ratinhos C57BL/6 através da homogeneização do baço em meio RPMI, suplementado com penicilina, estreptomicina, 2-mercaptoetanol e soro fetal bovino (RPMI). As células foram então distribuídas em placas de cultura de 96 poços (10⁶ células/poço) e adicionou-se PMA e ionomicina às amostras a testar (de forma a estimular os linfócitos) e, por fim, adicionou-se brefeldina A, que impede a secreção das citocinas que se acumulam no retículo endoplasmático das células, permitindo a sua melhor detecção. As células foram incubadas durante 5 h numa estufa a 37 °C numa atmosfera humidificada e com 5 % de CO₂. Os anticorpos foram adicionados contra os antigénios de superfície. Estas foram incubadas no escuro durante 25 min, tendo-se adicionado tampão e centrifugado, rejeitando-se o sobrenadante, de forma a retirar o excesso de anticorpo. De seguida, as células foram fixadas e permeabilizadas com formaldeído e saponina, respectivamente. Após fixação e permeabilização foi adicionado o anticorpo anti-IL-10 em tampão de permeabilização. Entre estas adições foram sempre feitos passos intermédios de incubação durante pelo menos 20 min no escuro e de adição de tampão PBS pH 7,5 diluído com azida e BSA, seguindo-se uma centrifugação e rejeição do sobrenadante para retirar os excessos de reagentes que não reagem com as células. Por fim, a avaliação de indução na produção de citocinas foi feita por citometria de fluxo.

2.8.4. Ensaios de activação de macrófagos

A capacidade das amostras em activar os macrófagos foi avaliada pela produção de óxido nítrico (NO). A forma de medição da produção de óxido nítrico é através da formação de nitritos (NO_2^-). Os nitritos são um dos produtos de degradação do óxido nítrico: $2 \text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{NO}_2^-$.

As células da medula óssea foram obtidas retirando o conteúdo femural dos ratinhos com HBSS (do inglês, “Hank’s Balanced Salt Solution”) gelado. Estas foram centrifugadas e o sobrenadante rejeitado de forma a garantir a remoção de tecido muscular e películas. As células foram ressuspensas em RPMI completo com 10% de LCCM (do inglês “L-929 cell conditioned médium (macrophage colony stimulation factor; Granulocyte colony stimulation factor”). Incubou-se durante a noite a 37 °C e em atmosfera humidificada e com 5% de CO_2 .

Recolheram-se as células não aderentes e adicionou-se o HBSS gelado de lavagem da placa. Procedeu-se a nova centrifugação, o sobrenadante foi rejeitado e as células foram novamente ressuspensas em RPMI completo mais LCCM. As células foram contadas de forma a ajustar a cerca de 5×10^5 células/mL e foram distribuídas pelos poços de placas.

Incubou-se a 37 °C e em atmosfera humidificada com 5 % de CO_2 e ao 4º dia foi adicionado a cada poço LCCM e ao 7º dia o meio foi renovado.

Ao 10º dia aspirou-se o meio de cultura e em cada poço colocaram-se as amostras a testar e os controlos positivos. Deixou-se a incubar durante 4 h a 37 °C e cada poço foi lavado 4 vezes com HBSS a 37 °C. Depois desta lavagem foi adicionado aos poços água e solução de saponina. Foram feitas as respectivas diluições e procedeu-se ao plaqueamento, iniciando-se a quantificação do tempo. A cada poço foram realizados os tratamentos pretendidos, diferentes amostras em diferentes concentrações e reincubaram-se as células a 37 °C em atmosfera de CO_2 durante 7 dias. Após esse tempo, lisaram-se as células adicionando saponina aos poços. Utilizando o reagente de Griess determinou-se a quantidade de nitritos produzidos através da medição da absorvância a 450 nm. O método de reagente de Griess baseia-se numa reacção química em que é utilizado sulfanilamida e dicloreto de N-1-naftiletilenodiamónio sob condições ácidas (ácido fosfórico) que detecta a presença de NO_2^- .

2.8.5. Ensaio *in vivo*

Ratinhos C57BL/6 foram injectados intraperitonealmente, em duplicado, com as amostras a testar ou tampão PBS (controlo).

Após 7 dias os ratinhos foram sacrificados e foram recolhidas células do baço. Estas células foram incubadas com os anticorpos específicos para cada ensaio, anti-CD138, anti-CD4 e anti-CD8 para marcar, respectivamente, plasmócitos (células produtoras de anticorpos), T-reguladoras e T-citotóxicas. Por fim, procedeu-se à análise por citometria de fluxo, tal como descrito no ponto 2.8.2..

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao longo deste capítulo iremos apresentar os resultados do trabalho realizado na obtenção de mananas do resíduo de café por extracção sequencial. Os extractos obtidos foram caracterizados, por diferentes métodos, quanto à sua composição. O extracto rico em mananas foi acetilado. Estas mananas acetiladas do resíduo de café, bem como as mananas naturalmente acetiladas obtidas da infusão do café, foram testadas como fonte de compostos bioactivos, nomeadamente, a actividade imunomoduladora. Como padrão de comparação foram utilizados extractos de *Aloe vera*, compostos essencialmente por acemananas, uma manana acetilada.

3.1. Caracterização da amostra do resíduo de café

A amostra de resíduo de café apresentava uma tonalidade castanha escura, característica deste tipo de material, e uma humidade de 64 ± 2 %. O resíduo de café seco foi analisado e verificou-se que possuía 35 % de polissacarídeos (**Tabela 3.1.**). A análise da composição em açúcares destes polissacarídeos permitiu-nos verificar que existiam 57 % de resíduos de manose, 26 % de resíduos de galactose, 11 % de resíduos de glucose e 6 % de resíduos de arabinose (**Tabela 3.1.**). Pela quantidade elevada de manose e a presença de galactose, complementada com a informação da literatura, concluímos que o resíduo de café é rico em galactomananas. Devido ao facto da quantidade de galactose ser elevada para pertencer apenas aos substituintes das galactomananas e devido também à presença de arabinose em quantidade significativa, pode-se inferir de que o resíduo de café contém também arabinogalactanas.

Tabela 3.1. Composição em açúcares do resíduo de café.

Amostra	Composição em açúcares (% mol)							% Açúcares na amostra
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	
Resíduo de Café	0±0	0±0	6±2	0±0	57±2	26±2	11±2	35,0±7

3.2. Fraccionamento do material de alto peso molecular por extracção com soluções alcalinas

As mananas do resíduo de café foram extraídas por tratamento com água quente e soluções alcalinas de NaOH conforme descrito no Capítulo 2- Materiais e Métodos. A quantidade de material extraído a partir do resíduo de café foi de 30 %, tendo permanecido insolúvel um resíduo que representava 49 % do material inicial (**Tabela 3.2.**). Este material corresponde ao material que não foi extraído com as soluções e métodos utilizados.

Dos diferentes extractos obtidos, os com maior quantidade de material polimérico são o “Sobrenadante H₂O” (3,7 %), o “Sobrenadante NaOH 1M” (6,2 %) e o “Precipitado NaOH 4M” (4,6 %) (**Tabela 3.2.**). A percentagem de material solúvel em água quente (“Sobrenadante H₂O”) indica que após a extracção com água, aquando da obtenção de um café expresso, ainda fica material polimérico retido no material insolúvel que é o resíduo de café. A existência de material solúvel em água no resíduo de café é devida à reduzida superfície de contacto e ao reduzido tempo de extracção de café com água quente, aquando da obtenção de café expresso. Analisando as quantidades obtidas de material extraído com soluções de NaOH de concentração 1M e 4M conclui-se que estas promovem a solubilização dos polímeros existentes no resíduo de café, como esperado.

Todos os extractos obtidos foram analisados quanto à quantidade e tipo de açúcares e os resultados são apresentados na **tabela 3.2.**

Os polissacarídeos extraídos com água quente, imidazol e diferentes soluções de NaOH são maioritariamente constituídos por manose, galactose, arabinose, pequenas quantidades de glucose e quantidades vestigiais de ramnose e fucose (**Tabela 3.2.**). No entanto, estes extractos, apresentam diferenças na sua composição em açúcares. Assim, nos extractos “Sobrenadante H₂O”, “Sobrenadante Imidazol”, “Precipitado Imidazol”, “Precipitado NaOH 4 M” e “Resíduo Final” o açúcar mais abundante é a manose, seguido pela galactose e a arabinose em menor percentagem. Entre estes extractos, verifica-se que, no caso dos extractos “Precipitado NaOH 4 M” e “Resíduo Final” a quantidade de arabinose é inferior em cerca de 1/5 em relação à quantidade de arabinose dos restantes extractos referidos. Estes dois extractos são ricos em resíduos de manose e galactose e

com reduzido número de resíduos de arabinose e glucose, concluindo-se que estes dois extractos são maioritariamente compostos por galactomananas.

Nos extractos “Sobrenadante NaOH 0,05 M”, “Precipitado NaOH 0,05 M”, “Sobrenadante NaOH 1 M”, “Precipitado NaOH 1 M”, “Sobrenadante NaOH 4 M” e “Sobrenadante Resíduo Final” o açúcar mais abundante é a galactose seguido da manose e arabinose. A composição em açúcares destes extractos sugere que são extractos constituídos por arabinogalactanas, outro polissacarídeo maioritário, para além das galactomananas, presente no café, constituídos por resíduos de galactose em ligação β -(1→3) e com resíduos substituídos na posição O-6 por resíduos de arabinose e galactose (Bradbury e Halliday, 1990; Fisher *et al.*, 2001).

Tabela 3.2. Rendimento e composição em açúcares do material polimérico do resíduo de café.

Extracto	Rendimento	Composição em açúcares (% mol)							% Açúcares na amostra
	%	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	
Sobrenadante H ₂ O	3,7	1 ^a ±0 ^b	1±1	12±1	1±1	46±6	36±5	2±1	20,9±2,0
Sobrenadante Imidazol	0,9	1±0	1±1	10±0	2±1	48±6	36±9	2±0	42,4±1,3
Precipitado Imidazol	0,0	2±1	0±0	11±1	0±0	43±0	41±2	3±0	25,2±2,7
Sobrenadante NaOH 0,05 M	0,3	1±0	0±0	11±1	0±0	39±0	46±1	2±0	35,9±6,0
Precipitado NaOH 0,05 M	0,1	3±0	1±0	14±0	0±0	32±0	46±1	4±0	9,8±1,1
Sobrenadante NaOH 1 M	6,2	1±0	0±0	14±1	0±0	14±1	69±0	1±0	29,9±2,2
Precipitado NaOH 1 M	0,2	1±0	0±0	10±0	4±0	25±2	52±1	7±1	14,3±3,0
Sobrenadante NaOH 4 M	1,4	1±0	0±0	12±1	1±0	14±0	69±2	3±0	40,3±3,0
Precipitado NaOH 4 M	4,6	0±0	1±0	2±0	0±0	87±0	8±0	2±0	73,0±5,3
Sobrenadante Resíduo Final	3,5	0±0	0±0	12±0	0±0	11±0	75±0	1±0	48,6±4,2
Resíduo Final	49,1	0±0	0±0	5±0	1±0	60±0	20±0	14±1	53,6±2,8

^a valores médios; ^b desvio padrão

Dado que se pretende obter as mananas do resíduo de café, foram analisadas e comparadas as percentagens de manose (resíduo maioritário das mananas) presentes nos diferentes extractos (**Figura 3.1.**).

Pela **figura 3.1.** verificamos que o extracto de resíduo final é o que possui maior quantidade manose, cerca de 16% do extracto é constituído por resíduos de manose, indicando que, após a extracção sequencial, a maior parte das mananas ainda se encontram no resíduo. Contudo, analisando os restantes extractos provenientes da extracção sequencial, verificamos que o extracto de precipitado NaOH 4 M possui maior quantidade de manose, cerca de 3% do material de extracto. Este extracto de precipitado NaOH 4 M é também o mais rico em açúcares, 73%, e com base na composição em açúcares (**Tabela 3.2.**) atrás discutida, concluímos ser este o extracto eleito para ser utilizado neste trabalho de investigação. Os outros extractos obtidos da extracção sequencial possuem quantidades de manose inferiores a 0,5% por material de extracto.

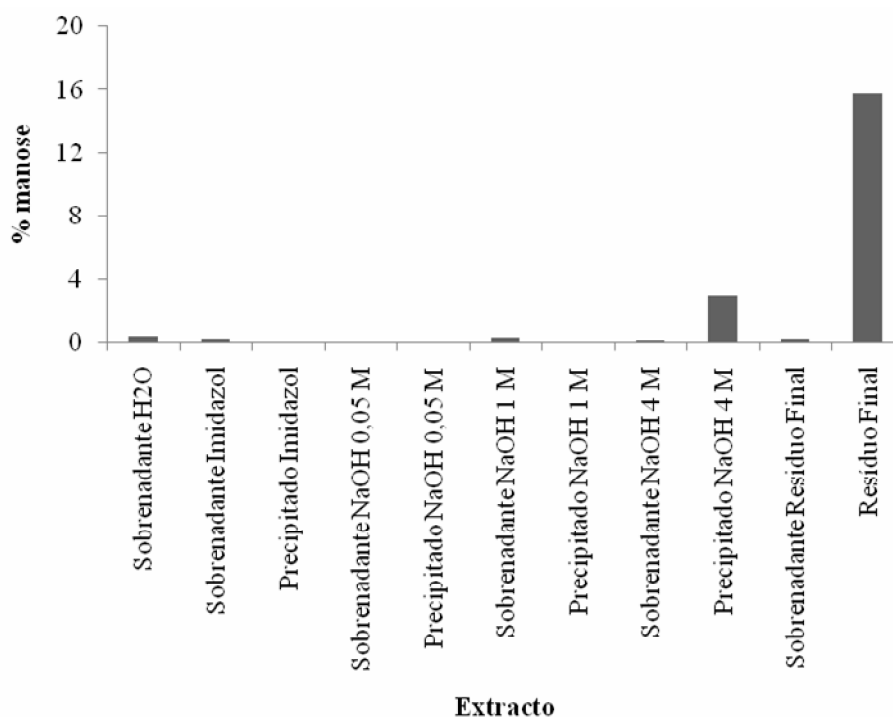


Figura 3.1. Quantidade de manose extraída em cada extracto obtido na extracção sequencial do resíduo de café

3.3. Acetilação do extracto rico em mananas do resíduo de café e caracterização das mananas acetiladas

Devido ao extracto de “Precipitado NaOH 4 M” ser insolúvel em água, só sendo solúvel em meio alcalino e precipitando quando a solução era neutralizada, procedeu-se à sua acetilação. A solubilidade das mananas em água aumenta com a acetilação do polímero. A acetilação da fracção ppdo NaOH 4M permitiu obter cinco fracções, três solúveis em água, uma solúvel em etanol e uma insolúvel em água. Estas 5 fracções foram analisadas quanto à quantidade e tipo de açúcares (**Tabela 3.3.**) e quanto ao grau de acetilação (**Tabela 3.4.**). Por outro lado, a acetilação poderá ser relevante para o possível efeito imunomodulador já que as mananas do *Aloe vera* e as mananas do café são elas próprias naturalmente acetiladas. Apesar de uma grande parte das mananas terem permanecido no material insolúvel, 8,4 % do material passou a ser solúvel (**Tabela 3.3.**). A essa fracção rica em mananas solubilizadas por acetilação designou-se RC1.

Tabela 3.3. Rendimento e composição em açúcares dos polissacarídeos solubilizados por acetilação do precipitado obtido na extracção com 4M NaOH do resíduo de café.

Fracção	Rendimento		Composição em açúcares (% mol)							%Açúcares na amostra
	m (g)	%	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	
Material solúvel em H ₂ O (RC1)	0,0844	8,4	0±0	0±0	6±0	1±0	69±1	23±1	2±0	54,7
Material solúvel em etanol (Et _{sn})	0,0039	0,4	2	0	4	0	45	34	16	4,8
Precipitado retentato (material solúvel em etanol) (Et _{ppt})	0,0159	1,6	2	0	8	2	42	20	26	5,1
H ₂ O retentado do material insolúvel	0,0136	1,4	0±0	0±0	4±1	1±1	76±2	15±0	4±1	49,2
Material insolúvel	0,8360	83,6	0±0	0±0	2±0	0±0	89±2	6±0	2±0	75,4

Do procedimento de acetilação do extracto de “Precipitado NaOH 4 M” obtiveram-se 5 fracções: uma fracção de material solúvel em água (RC1), uma fracção de material solúvel em etanol (Et_{sn}), uma fracção de precipitado do retentato proveniente da diálise a 4°C do material solúvel em etanol (Et_{ppt}), uma fracção de água do retentado proveniente da diálise a 4°C do material insolúvel e uma fracção correspondente ao material que não solubilizou (Material insolúvel).

Em termos de quantidade de açúcares totais presentes em cada fracção, as fracções mais ricas em açúcares totais são o material insolúvel que possui 75% de açúcares, RC1 que possui 55% e a fracção H₂O do retentado do material insolúvel que possui 49% de açúcares. A fracção de material solúvel em etanol (Et_{sn}) e a fracção de precipitado do retentado da fracção solúvel em etanol (Et_{ppt}) possuem uma quantidade em açúcares muito reduzida, cerca de 5% de açúcares. Em acetilações futuras, estas fracções podem ser rejeitadas. Em termos de quantidade de material obtido, estas duas fracções a desprezar são fracções obtidas em reduzida quantidade, 0,39 mg e 1,59 mg. A fracção água do retentado proveniente da diálise a 4°C do material insolúvel também é uma fracção pobre em quantidade de material (1,36 mg). Assim, neste procedimento, as fracções a estudar deverão ser as obtidas a partir do material solúvel em água, para além do resíduo insolúvel. O material solúvel em etanol poderá não ser considerado.

Analisando a fracção RC1 (solúvel em água) e a fracção insolúvel segundo a sua composição em açúcares, verificamos que ambas são fracções ricas em manose, possuem também resíduos de galactose e arabinose e alguma glucose. A composição em açúcares destas duas fracções apresentada na **Tabela 3.3.** sugere a presença de galactomananas. A galactose e a arabinose são resíduos que ocorrem naturalmente nas mananas do café como ramificações da cadeia principal. Contudo, devido à quantidade dos resíduos de galactose, 23%, não se poderá excluir a hipótese da amostra RC1 poder conter uma pequena quantidade de arabinogalactanas juntamente com as galactomananas, possivelmente devido à co-solubilização de arabinogalactanas.

O grau de acetilação das mananas das fracções estudadas (**Tabela 3.4.**) foi determinado por quantificação do ácido acético libertado após saponificação dos grupos acetilo e acidificação de acordo com a metodologia proposta por Nunes *et al.* (2006b) (ponto 2.6. do capítulo 2).

Tabela 3.4. Grau de acetilação das fracções de mananas acetiladas provenientes da acetilação do precipitado obtido na extracção com 4M NaOH do resíduo de café.

Fracção	Grau de acetilação
	(mol ácido acético/ mol resíduo de açúcar)
Material Solúvel (RC1)	0,84 ± 0.01
Material Insolúvel	0,39 ± 0.04

Os polissacarídeos de RC1, solúveis em água, possuem, em média, 0,84 grupos acetilo por resíduo de açúcar. Pode ser que o material insolúvel, por se encontrar menos acetilado (0,39), tenha permanecido insolúvel em água.

Devido a não ter sido ainda conseguido solubilizar a maior parte das mananas, foi realizado um segundo procedimento de acetilação, utilizando o material insolúvel da primeira acetilação. Este material foi caracterizado quanto à sua quantidade e tipo de açúcar (**Tabela 3.5.**) e quanto ao seu grau de acetilação (**Tabela 3.6.**).

Apesar da maior parte das mananas ainda ter permanecido no material insolúvel, 3,7 % do material passou a ser solúvel. A essa fracção designamos por RC2. A acetilação faz aumentar a massa molecular das mananas, daí o facto do rendimento ser superior a 100% (a massa obtida é superior à massa inicial), no caso da fracção de material insolúvel.

A fracção RC2 mostra ser mais rica em manose do que a fracção RC1, constituindo a galactose e arabinose somente 6 e 1 % (**Tabela 3.5.**), podendo estes açúcares ser constituintes apenas da própria manana. A fracção RC2 é uma fracção mais pura em galactomananas que RC1.

Tabela 3.5. Rendimento e composição em açúcares dos polissacarídeos solubilizados por acetilação do material insolúvel proveniente da acetilação do precipitado obtido na extração com 4 M NaOH do resíduo de café.

Fracção	Rendimento		Composição em açúcares (% mol)							% Açúcares na amostra
	m (g)	%	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	
Material solúvel em H ₂ O (RC2)	0.0186	3.7	0±0	0±0	1±0	0±0	90±1	6±1	2±1	43,7±53
H ₂ O retentado (material insolúvel)	0.0054	1.1	0	0	1	0	90	6	2	65,3
Material insolúvel	0.5915	117,5	0±0	0±0	1±0	0±0	90±0	6±0	2±0	83,0±25

RC2 é um material com 0,94 grupos acetilados por resíduo de açúcar (Tabela 3.6.). O material insolúvel, tal como o da 1ª acetilação, apresenta em média 0,39 grupos acetilo por resíduo de café.

Tabela 3.6. Grau de acetilação das fracções de mananas acetiladas provenientes da acetilação do material insolúvel proveniente da acetilação do precipitado NaOH 4 M do resíduo de café

Fracção	Grau de acetilação
	(mol ácido acético/ mol resíduo de açúcar)
Material Solúvel (RC2)	0,94 ± 0,03
Material Insolúvel	0,39 ± 0,01

Este material insolúvel foi sujeito a nova acetilação. As condições do procedimento de acetilação foram ligeiramente diferentes das condições das acetilações anteriores tal como descrito no capítulo 2- Material e métodos, nomeadamente o aumento da quantidade de anidrido acético e de iodo adicionada. Devido à reduzida quantidade de material solúvel obtido (Tabela 3.7.) não foi feita a sua caracterização.

Tabela 3.7. Rendimento dos polissacarídeos solubilizados por acetilação do material insolúvel proveniente da acetilação do material insolúvel da acetilação do precipitado NaOH 4 M do resíduo de café

Fracção	Rendimento	
	m (g)	%
Material solúvel em H ₂ O (RC3)	0,0075	1,8
Material insolúvel	0,4276	102,3

Os materiais RC1 e RC2 obtidos nas 1^a e 2^a acetilações foram os utilizados para os ensaios de efeito imunomodulador realizados.

Possíveis optimizações na solubilização do material em estudo terão que ser objecto de trabalhos futuros. Esta optimização do procedimento poderá, entre outras, envolver a variação das condições de acetilação. O baixo rendimento do procedimento de acetilação pode ser devido ao facto dos polímeros em estudo poderem estar associados entre si por pontes de hidrogénio e/ou poderem ser polímeros muito compridos. A optimização deste procedimento de acetilação poderá consistir numa hidrólise prévia.

3.4. Caracterização de mananas acetiladas obtidas do resíduo de café por espectrometria de massa, ESI-MS e ESI-MS/MS

Para o estudo de oligossacarídeos a espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI) é muito utilizada. A caracterização estrutural destes, nomeadamente com a identificação da sua composição em monossacarídeos, identificação do tipo de ligação e ramificações presentes na cadeia principal, é conseguida por Espectrometria de Massa Tandem (MS/MS) de iões formados em ESI.

Neste capítulo iremos apresentar os resultados obtidos da caracterização estrutural, por ESI-MS e ESI MS/MS, de mananas extraídas do resíduo de café conforme descrito em 2.3. e acetiladas pelas metodologias descritas em 2.5. (RC1).

3.4.1. Análise de espectros de ESI-MS

Após hidrólise enzimática das mananas acetiladas da fracção RC1 com a *endo*- β -(1 \rightarrow 4)-D-mananase, os oligossacarídeos formados foram fraccionados por cromatografia de exclusão molecular de modo a obter misturas mais simples e mais fáceis de analisar por ESI-MS. Obtiveram-se várias fracções, como se mostra na **Figura 3.2.** que representa o cromatograma obtido após separação em Biogel P2 da mistura de oligossacarídeos obtidos após hidrólise enzimática. Verificou-se a eluição dos oligossacarídeos em quatro picos principais, dentro do limite de separação da resina (100-1800Da).

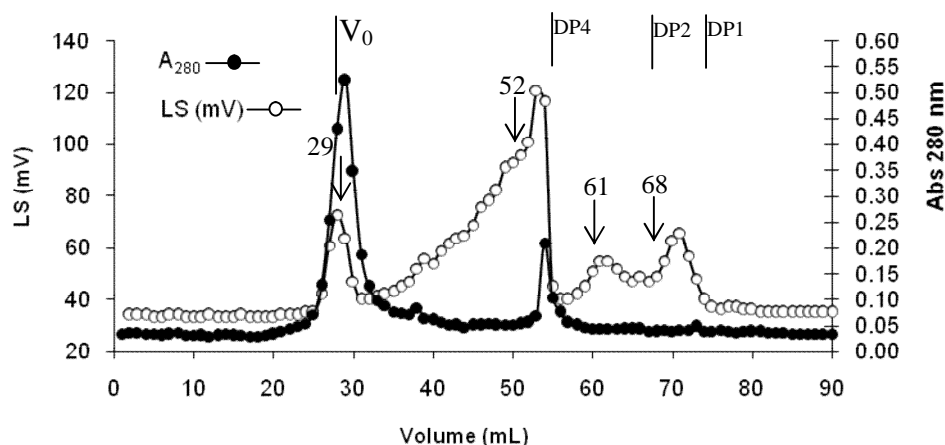


Figura 3.2. Cromatografia de exclusão molecular da fracção acetilada, rica em mananas, do resíduo de café (RC1) obtida após hidrólise enzimática com a *endo*- β -mananase.

V_0 - volume morto; DP1, DP2 e DP4- volume de eluição de um monossacarídeo, dissacarídeo e tetrassacarídeo padrão, respectivamente.

Embora a eluição dos picos identificados não corresponda a uma boa separação cromatográfica, seleccionaram-se várias fracções, respectivamente as fracções 29, 52, 61 e 68, de modo a caracterizar os oligossacarídeos presentes. Resultados publicados de caracterização por ESI-MS de oligossacarídeos de glucuronoxilanas de azeitona e pêra (Reis *et al.*, 2002) e galactomananas da bebida de café (Nunes *et al.*, 2005), fraccionados por cromatografia de exclusão molecular, demonstrou que a associação de cromatografia de exclusão molecular e posterior caracterização por MS é um método válido, mesmo nos casos em que a separação cromatográfica tenha baixa resolução.

Nos espectros de ESI-MS (**Figura 3.3.**) das fracções analisadas observaram-se os iões $[M+Na]^+$ dos diferentes oligossacarídeos presentes nas diferentes fracções. A formação dos iões $[M+Na]^+$ é característica da ionização de oligossacarídeos quer pelo método de ionização ESI quer por MALDI (Harvey, 2006), mesmo sem adição de qualquer sal de sódio à amostra ou ao sistema de solventes utilizado. Os iões observados e identificados nos espectros de ESI-MS das diferentes fracções estão apresentados na **Tabela 3.8.**, com indicação dos valores de m/z dos aductos de sódio, $[M+Na]^+$ bem como a sua possível identificação atribuída com base no peso molecular, na análise de açúcares feita previamente e apresentada em 3.3. e no estudo dos espectros de ESI-MS/MS.

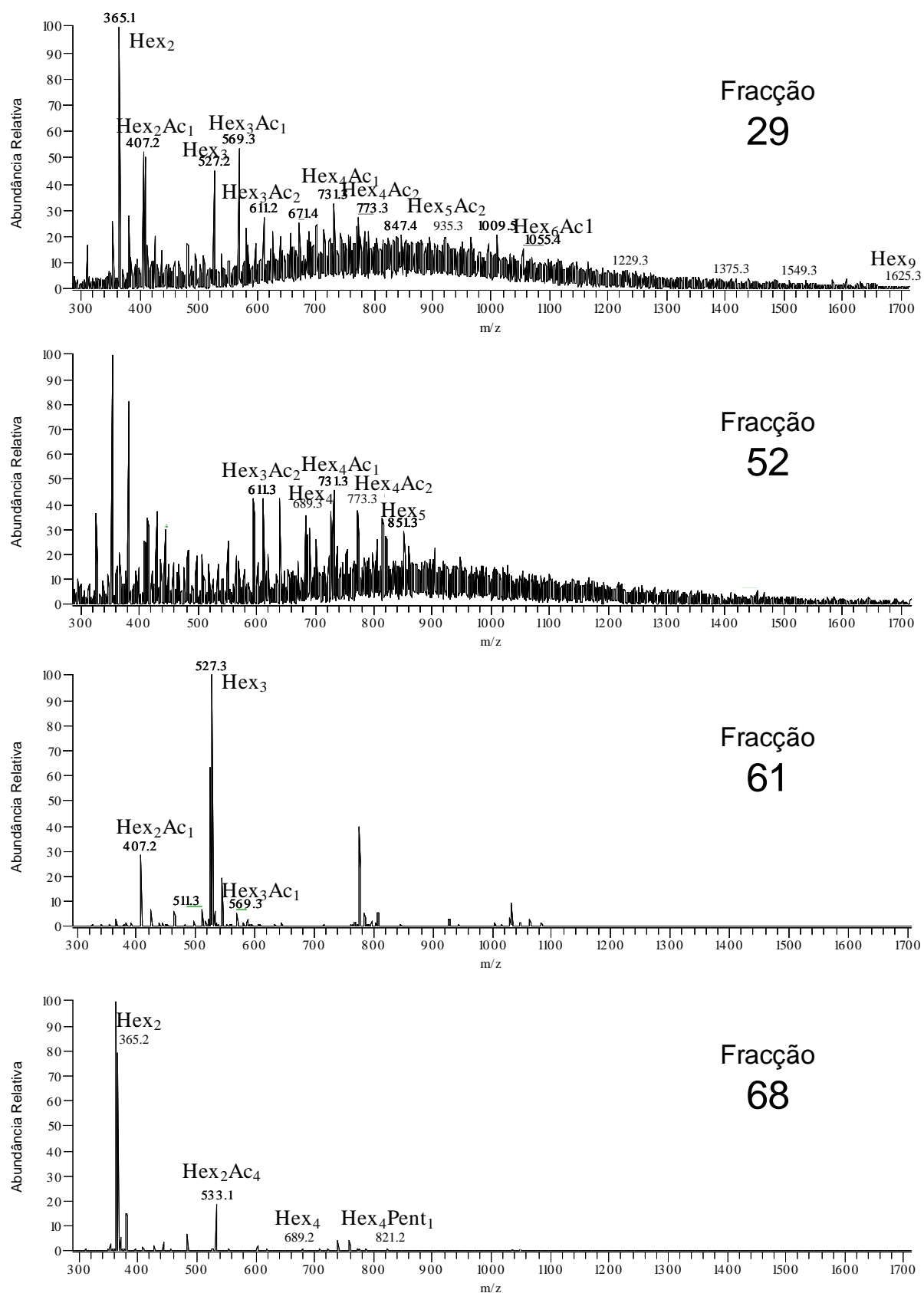


Figura 3.3. Espectros de ESI-MS das fracções 29, 52, 61 e 68.

Tabela 3.8. Resumo dos iões observados nos espectros de ESI-MS das diferentes fracções estudadas, apresentando os valores de m/z dos respectivos iões $[M+Na]^+$, respectivas identificações e fracções em que foram encontrados.

Hex _n Pent _m Desoxi _p			Ac				
			0	1	2	3	4
n m p			m/z				
Hex _n	2	0	0	365 F29/ F68	407 F29/ F61/ F68		533 F68
	3	0	0	527 F29/ F61	569 F29/ F52/F61	611 F29/ F52	
	4	0	0	689 F29/ F52/ F61/ F68	731 F29/ F52	773 F52	815 F29
	5	0	0	851 F52	893 F29	935 F29	977 F29
	6	0	0		1055 F29	1097 F29	
	8	0	0			1421 F29	
	9	0	0				1625 F29
Hex _n Pent _m	2	1	0	497 F61	539 F29	581 F29	623 F29
	2	2	0		671 F29	713 F29	
	2	3	0		803 F29		
	3	1	0	659 F68	701 F29/ F52	743 F29	785 F29
	3	2	0		833 F29	875 F29	
	3	3	0		965 F29		
	4	1	0	821 F52/ F68	863 F29	905 F29	1079 F29
	4	2	0		995 F29	1037 F29	
	5	1	0		1025 F29	1067 F29	1109 F29
	5	2	0		1157 F29	1199 F29	
	5	3	0		1289 F29		
	6	1	0			1229 F29	
	6	2	0			1361 F29	
Hex _n Desoxi _p	1	0	1	349 F68			
	2	0	1	511 F61	553 F29		

Hex _n Pent _m Desoxi _p	2	0	2	657		
				F29		
	1	1	1	481		
				F29		
	2	1	1	643		
				F29		
	3	1	1	847		
				F29		
	4	1	1		1009	
					F29	
	6	1	1		1333	1375
					F29	F29
	6	2	1			1549
						F29

A enzima *endo*- β -(1 \rightarrow 4)-D-mananase actua clivando resíduos de manose ligados em ligação β -(1 \rightarrow 4) sempre que o resíduo no lado do terminal redutor da ligação glicosídica a clivar se encontre livre de grupos substituintes, formando oligossacarídeos com, pelo menos, um resíduo de manose no terminal não redutor não substituído (Daas *et al.*, 2000). No pressuposto de que a hidrólise seja completa, a presença no hidrolisado de oligossacarídeos com número de hexoses maior do que 2, indica a presença de ramificações com galactose, a possível presença de glucose na cadeia principal ou a presença de grupos acetilo nos resíduos de manose. Estas características estruturais correspondem aos pontos da estrutura do polissacarídeo que não são susceptíveis à acção desta enzima. Se a enzima não tiver actuado completamente também serão encontrados oligossacarídeos compostos apenas por resíduos de manose da cadeia principal.

Analisando as diferentes fracções verificou-se que a fracção 68 é composta por oligossacarídeos de menor peso molecular, logo menor grau de polimerização (DP=[2-4]) (Hex_nAc_x, n=[2-4] e x=[0-4] e Hex_nPent_m, n=[3-4] e m=[1]). A fracção 29 é composta principalmente por oligossacarídeos de maior peso molecular, DP=[2-9]. As fracções intermédias correspondem a oligossacarídeos com grau de polimerização entre 2 e 5.

A análise dos espectros de ESI-MS (**Figura 3.3.**) permitiu identificar oligossacarídeos de hexose, (Hex_n, n=[2-9]). Estes oligossacarídeos podem corresponder a estruturas lineares de resíduos de manose onde a enzima não actuou ou podem corresponder a oligossacarídeos que possuam na sua cadeia principal resíduos de glucose tal como descrito para as mananas do café verde por Nunes *et al.* (2005). Estes

oligossacarídeos de hexoses também podem corresponder a estruturas ramificadas, com galactose ligada por ligação α -(1→6) aos resíduos de manose da cadeia principal, característico da constituição das galactomananas (Nunes *et al.*, 2005). Isto está de acordo com a análise dos açúcares constituintes destas amostras que mostrou a presença de glucose, galactose e manose na proporção de 1:12:35 (**Tabela 3.3.**). Por análise dos espectros de ESI-MS foram identificados também oligossacarídeos com pentose, possivelmente arabinose como ramificação da cadeia de manoses ($\text{Hex}_n\text{Pent}_m$, $n=[2-6]$ e $m=[1-3]$). Foram também identificados oligossacarídeos compostos por desoxi-hexoses e hexoses ($\text{Hex}_n\text{Desoxi}_p$, $(n,p)=(1,1); (2,1); (2,2)$) alguns dos quais podem estar ramificados com arabinose ($\text{Hex}_n\text{Pent}_m\text{Desoxi}_p$, $(n,m,p)=(1,1,1); (2,1,1); (3,1,1); (4,1,1); (6,1,1); (6,2,1)$).

Na amostra estudada foram identificados também oligossacarídeos acetilados com vários graus de acetilação, Ac_x , $x=[1-4]$, de cada uma das séries anteriormente descritas, Hex_nAc_x , $\text{Hex}_n\text{Pent}_m\text{Ac}_x$ e $\text{Hex}_n\text{Pent}_m\text{Desoxi}_p\text{Ac}_x$, uma vez que as galactomananas foram solubilizadas por um processo de acetilação como descrito em 2.5.

Na **tabela 3.8.** estão indicadas as frações em que foram identificados os iões com um determinado valor de m/z . Verifica-se que existem iões com o mesmo valor de m/z em frações diferentes, que eluem de forma diferente pela coluna de exclusão molecular, possivelmente devido à presença de estruturas isoméricas.

A composição dos diferentes iões foi proposta de acordo com os dados obtidos por Espectrometria de Massa Tandem, utilizando um espectrómetro de massa trapa de iões (do inglês Ion Trap). Este espectrómetro de massa permite a realização de espectros de ESI-MS/MS o que nos permitiu obter alguma informação sobre a sequência em monossacarídeos e a possível distribuição e localização dos grupos acetilo.

3.4.2. Análise de espectros de ESI-MS/MS

A fragmentação de oligossacarídeos sob condições de ESI-MS/MS resulta em quebras de ligações glicosídicas entre dois resíduos de açúcar e em quebras do anel (Figura 3.4.).

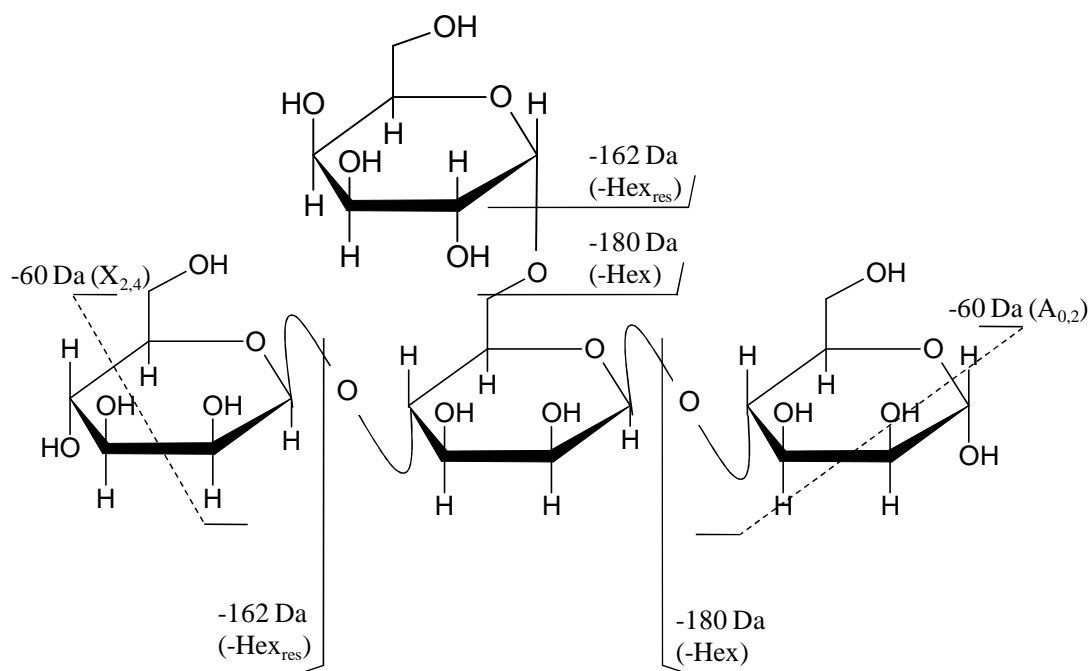


Figura 3.4. Formação de íons fragmento de um trissacarídeo de manoses em ligação β -(1 \rightarrow 4) substituído com galactose.

Os fragmentos resultantes das quebras das ligações glicosídicas dão informação sobre a composição em monossacarídeos. A fragmentação observada para as quebras do anel permite concluir acerca do tipo de ligação presente, pela perda de $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (-60 Da), $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ (-90 Da), e $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_8$ (-120 Da) para dissacarídeos ligados por (1 \rightarrow 6); pela perda de $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (-60 Da) e $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (-120 Da) para dissacarídeos ligados por (1 \rightarrow 4); pela perda de $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ (-90 Da) para dissacarídeos ligados por (1 \rightarrow 3), e pela perda de $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_8$ (-120Da) para dissacarídeos ligados por (1 \rightarrow 2) (Hofmeister *et al.*, 1991 e Asam e Glish, 1997).

Os espectros de ESI-MS/MS foram obtidos para todos os íons identificados. No entanto, uma vez que o objectivo do nosso trabalho é a caracterização das mananas acetiladas, apenas iremos apresentar e discutir os espectros dos oligossacarídeos mais

simples e representativos das principais séries previamente identificadas, Hex_nAc_x e $\text{Hex}_n\text{Pent}_m\text{Ac}_x$

3.4.2.1. ESI-MS/MS de Hex_nAc_x

Foram adquiridos os espectros de ESI-MS/MS de todos os iões desta série e iremos apresentar como exemplo os espectros correspondentes aos oligossacarídeos constituídos por três hexoses (Hex_3), três hexoses e um grupo acetilo (Hex_3Ac) e três hexoses e dois grupos acetilo (Hex_3Ac_2). Na **Figura 3.5. (a/b/c)** encontram-se apresentados os espectros de MS/MS dos iões de m/z 527, 569 e 611, correspondentes aos iões $[\text{M}+\text{Na}]^+$ dos oligossacarídeos Hex_3 , Hex_3Ac e Hex_3Ac_2 , respectivamente.

Na **Figura 3.5.a**, que representa o espectro de MS/MS do ião de m/z 527, podemos observar a perda principal de um resíduo de hexose (-162 Da) com formação do ião de m/z 365 correspondente a $[\text{Hex}_2+\text{Na}]^+$ e a perda de uma hexose (-180 Da) com formação do ião de m/z 347. Observa-se também a perda de água a partir do terminal redutor (-18 Da) e a perda de -60 Da ($-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) e -120 Da ($-2 \times \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) correspondentes a quebras do anel pirânico de uma e duas hexoses terminais em ligação 1-4. Com base nestes dados propomos que o ião m/z 527 corresponde a um trissacarídeo de hexose com possíveis estruturas **a₁** e **a₂**, conforme descrito na **Figura 3.6**. Podem estar presentes estruturas lineares (**a₁**) ou ramificadas (**a₂**) de hexoses. É possível que estas ramificações sejam de galactose, ligadas à manose por ligação (1→6), descritas para os resíduos ramificados de galactomananas das infusões de café por Nunes *et al.* (2005). Este trissacarídeo Hex_3 elui em diferentes picos que podem corresponder a diferentes estruturas isoméricas possíveis para este trissacarídeo. Deverá eluir primeiramente a estrutura de maior volume hidrodinâmico, a estrutura ramificada, eluindo mais tarde a estrutura linear, inferindo-se que a estrutura presente nesta fracção 29 é a ramificada, **a₁** **Figura 3.6**.

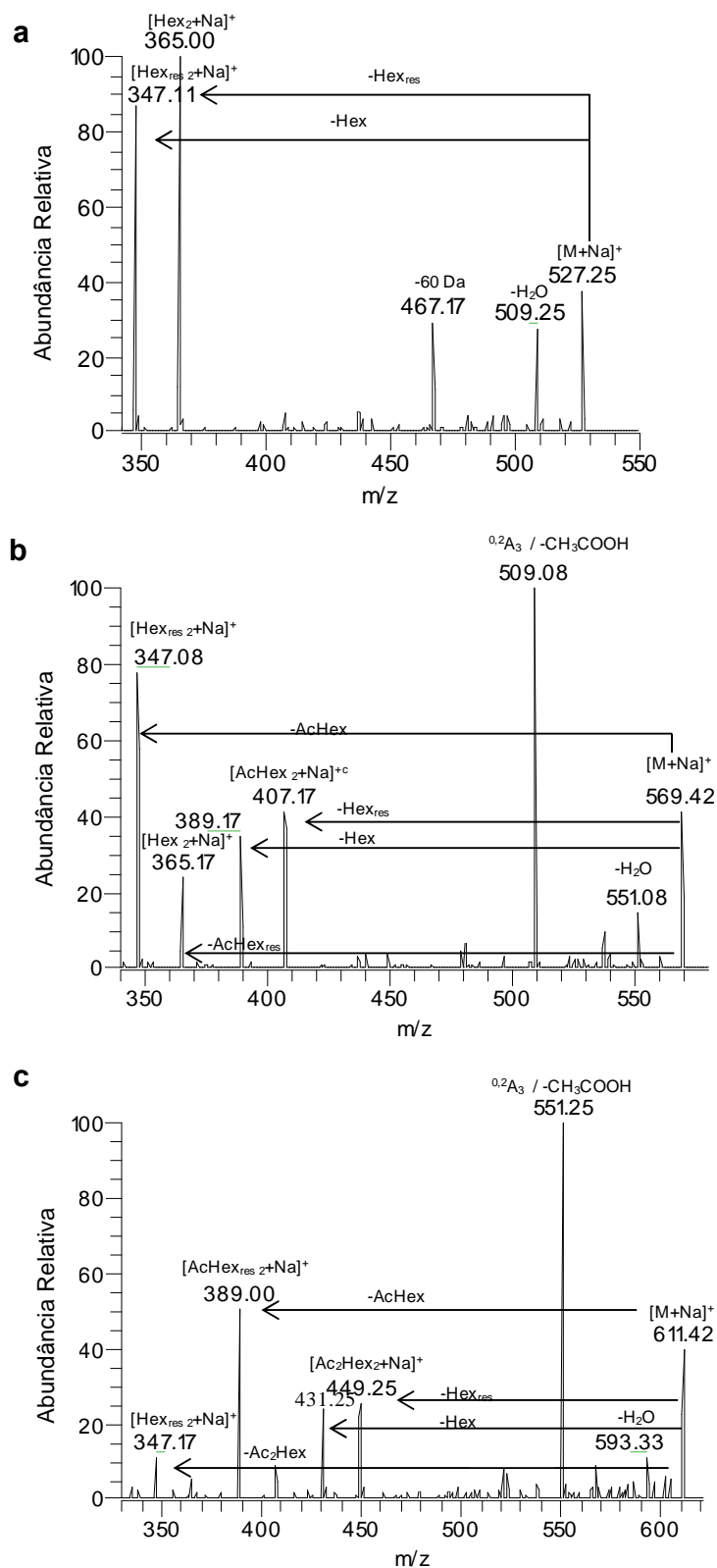


Figura 3.5. Espectros de ESI-MS/MS dos íons de m/z 527, 569 e 611, correspondentes aos íons $[M+Na]^+$ dos oligossacarídeos Hex_3 (a), Hex_3Ac (b) e Hex_3Ac_2 (c), respectivamente.

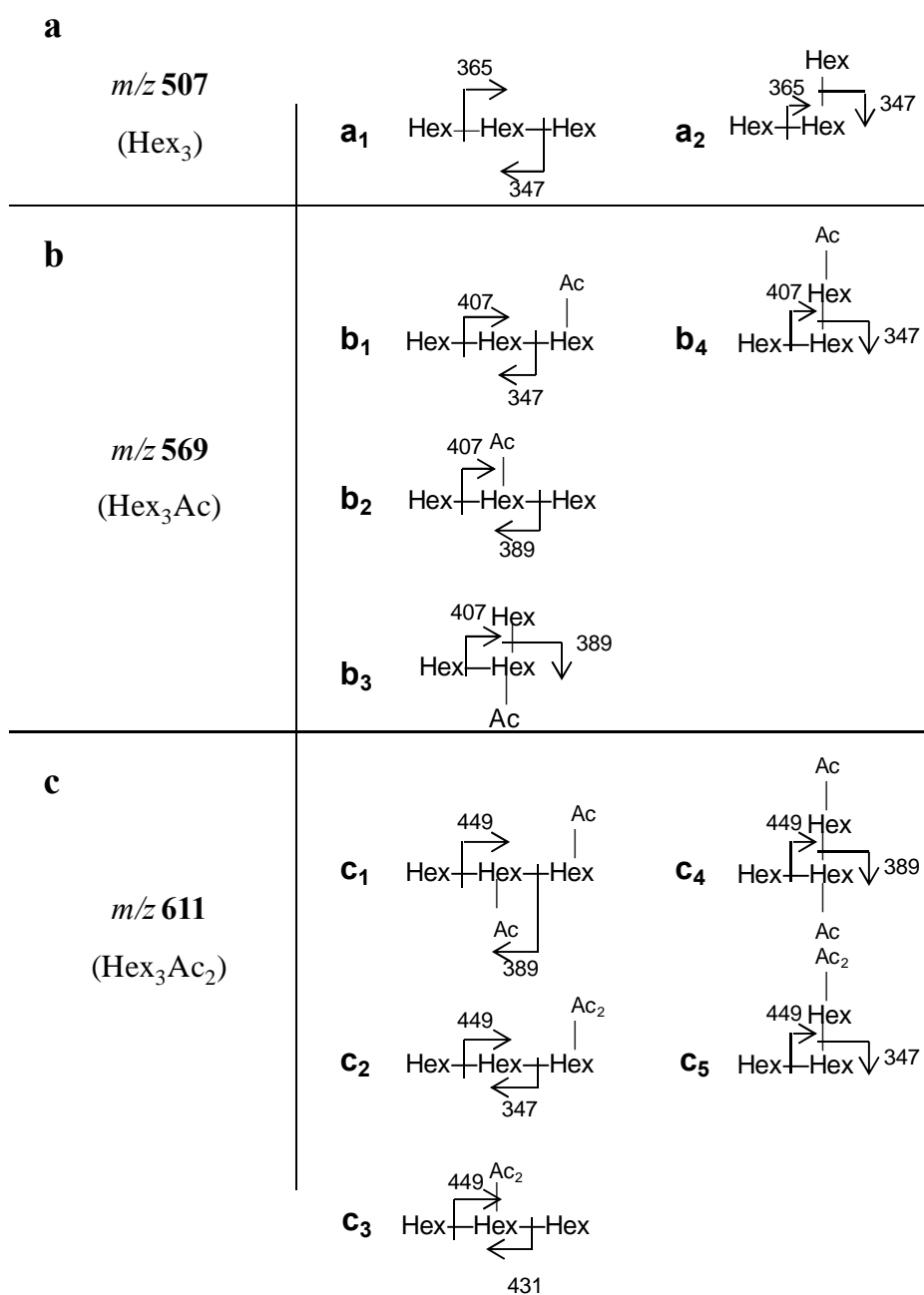


Figura 3.6. Estruturas dos oligossacarídeos Hex₃ (a), Hex₃Ac (b) e Hex₃Ac₂ (c), respectivamente, propostas com base nos espectros de ESI-MS/MS dos iões de m/z 527, 569 e 611.

A **Figura 3.5.b** representa o espectro de MS/MS do ião m/z 569, que corresponde ao oligossacarídeo com três hexoses e um grupo acetilo. Neste espectro podemos observar a perda principal do grupo acetilo (-60 Da) sob a forma de ácido acético com formação do ião de m/z 509. A perda de -60 Da também pode corresponder à quebra do anel resultante

das hexoses em ligação 1-4 da cadeia principal. Observa-se a perda de hexose (-180 Da) com formação do ião de m/z 389 e a perda de resíduo de hexose (-162 Da) com formação do ião m/z 407. Estas fragmentações sugerem a presença de isómeros em que os terminais ou as ramificações de hexoses não têm grupos acetilo. A formação dos iões m/z 365 e 347 a partir do ião $[M+Na]^+$ indica a perda de hexose com um grupo acetilo (-AcHex_{res} e -AcHex, respectivamente). Estas diferentes vias de fragmentação a partir do ião $[M+Na]^+$ levam a propor uma série de possíveis estruturas acetiladas presentes que se encontram representadas na **Figura 3.6** (estruturas **b₁**, **b₂**, **b₃** e **b₄**).

Na **Figura 3.5.c**, que representa o espectro de MS/MS do ião 611, constituído por três hexoses e dois grupos acetilo, podemos observar a perda principal do grupo acetilo (-60Da) com formação do ião de m/z 551. Observa-se a perda de uma hexose correspondente à perda de 180 Da com formação do ião de m/z 431 e a perda de um resíduo de hexose (-162 Da) com formação do ião de m/z 449. Estas fragmentações sugerem a presença de isómeros em que os terminais ou as ramificações de hexoses não têm grupos acetilo. Observa-se também a perda de água a partir do terminal redutor (-18 Da), a perda de -60Da correspondendo às quebras do anel de hexose terminal em ligação (1→4), da cadeia principal do polímero. A formação do ião m/z 389 e de m/z 347 a partir do ião $[M+Na]^+$ indica a perda de hexose com um e dois grupo acetilo, respectivamente, indicando a presença de estruturas com os dois grupos acetilo na mesma hexose ou cada acetilo numa hexose diferente. Estas diferentes vias de fragmentação a partir do ião $[M+Na]^+$ levam a propor uma série de possíveis estruturas presentes conforme representado na **Figura 3.6**.

Esta metodologia aplicada aos outros elementos desta série permitiram identificar a presença de grupos acetilo ao longo da cadeia e na ramificação de hexose, bem como a presença de dois acetilos no mesmo resíduo de açúcar.

3.4.2.2. ESI-MS/MS de Hex_nPent_mAc_x

Foram adquiridos os espectros de ESI-MS/MS de todos os iões da série Hex_nPent_mAc_x (n=[2-6], m=[1-3] e x=[0-3]) e iremos apresentar como exemplo os espectros dos oligossacarídeos constituídos por três hexoses e uma pentose (Hex₃Pent₁), por três hexoses, uma pentose e um grupo acetilo (Hex₃Pent₁Ac₁), por três hexoses, uma pentose e dois grupos acetilo (Hex₃Pent₁Ac₂) e por três hexoses, uma pentose e três grupos acetilo (Hex₃Pent₁Ac₃). Na **Figura 3.7. (a/b e c/d/e)** encontram-se apresentados os espectros de MS/MS dos iões de *m/z* 659, 701, 743 e 785, correspondentes aos iões [M+Na]⁺ dos oligossacarídeos Hex₃Pent₁, Hex₃Pent₁Ac₁, Hex₃Pent₁Ac₂ e Hex₃Pent₁Ac₃ respectivamente.

O espectro de MS/MS do ião 659 corresponde ao oligossacarídeo com três hexoses e uma pentose. A presença de hexoses é inferida pelos iões de *m/z* 497 e 479, resultantes da perda de -162 Da e -180 Da, respectivamente. O ião fragmento de *m/z* 347 (estrutura **a₂** da **Figura 3.8.**) corresponde à perda de um resíduo de pentose e uma hexose (180+132) o que confirma a presença de pentoses como ramificações das mananas. Estas fragmentações levam a propor duas estruturas possíveis para este tetrassacarídeo (**Figura 3.8. (a₁ e a₂)**). Observa-se também a perda de uma molécula de água (-18 Da) e a perda de -60 Da e -120 Da, correspondente às quebras do anel de hexose em ligação 1-4.

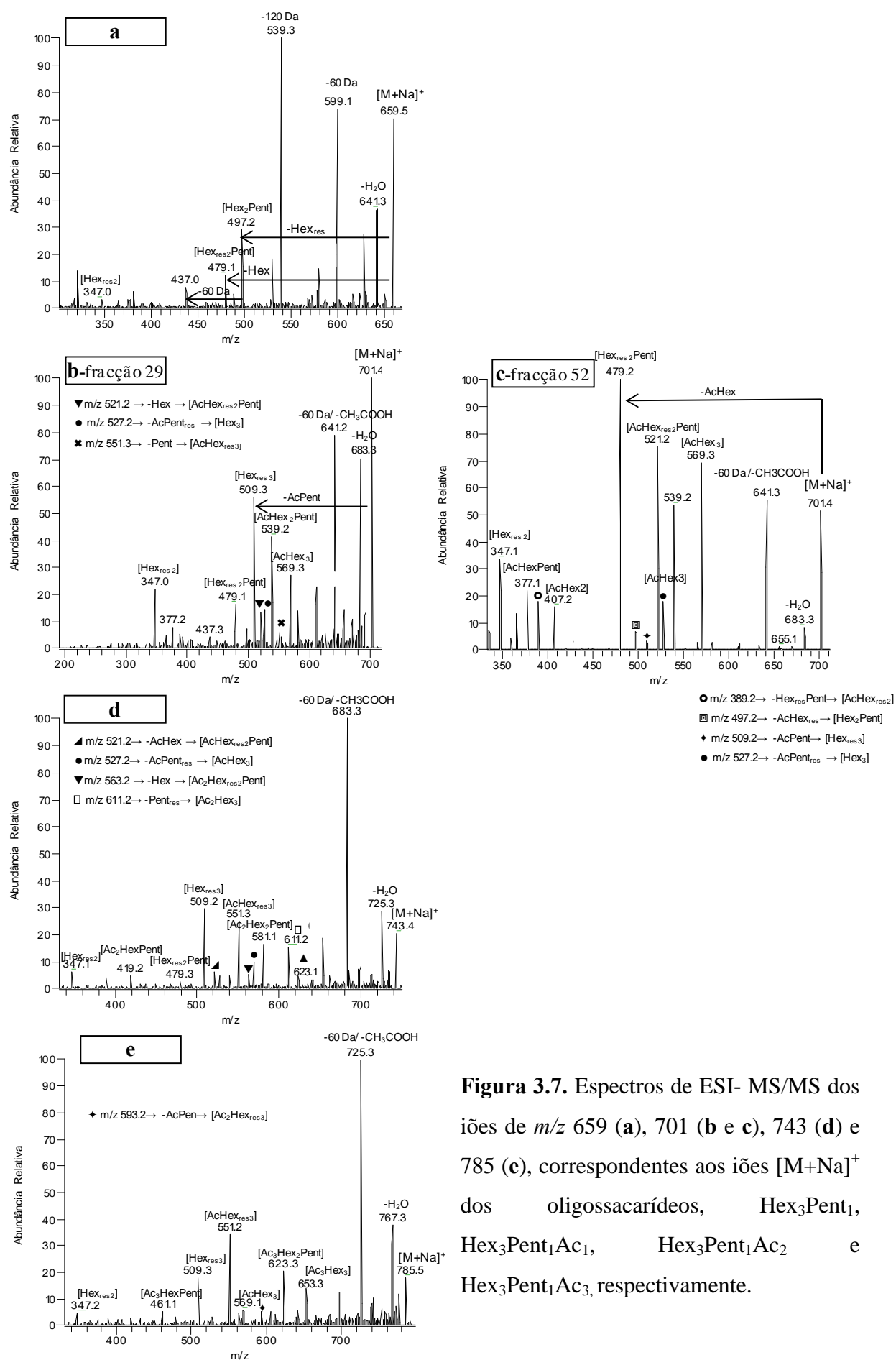


Figura 3.7. Espectros de ESI- MS/MS dos iões de m/z 659 (a), 701 (b e c), 743 (d) e 785 (e), correspondentes aos iões $[M+Na]^+$ dos oligossacarídeos, Hex_3Pent_1 , $Hex_3Pent_1Ac_1$, $Hex_3Pent_1Ac_2$ e $Hex_3Pent_1Ac_3$, respectivamente.

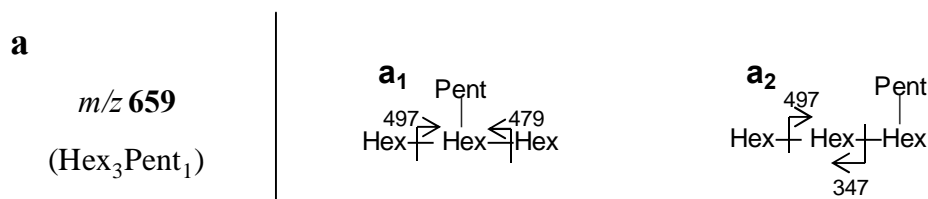


Figura 3.8. Estruturas dos oligossacarídeos Hex₃Pent₁ (**a**) propostas com base no espectro de ESI-MS/MS do ião de m/z 659.

O oligossacarídeo com três hexoses, uma pentose e com um grupo acetilo, Hex₃Pent₁Ac₁, de m/z 701 eluiu em duas zonas diferentes do cromatograma, e os seus espectros de MS/MS encontram-se apresentados nas **Figuras 3.7. b** (fracção 29) e **c** (fracção 52). A **Figura 3.7. b** corresponde ao espectro de MS/MS do ião de m/z 701 da fracção 29. Este mostra o ião de m/z 509 e o ião de m/z 527, correspondente à perda de uma pentose substituída com um grupo acetilo (-192 Da) (estrutura **b₁** da **Figura 3.9.**) e à perda de um resíduo de pentose também com um grupo acetilo (-174 Da) (estrutura **b₂** da **Figura 3.9.**), respectivamente. O grupo acetilo também pode estar localizado em hexoses (estruturas **b₃-b₆** da **Figura 3.9.**).

Analisando as abundâncias relativas dos diferentes iões fragmento verificamos que a acetilação nesta fracção 29 parece ser preferencial na ramificação de pentose. O ião de m/z 509, correspondente à perda de uma pentose acetilada, e é maioritário em relação ao ião fragmento de hexose acetilada (iões de m/z 479).

Curiosamente, analisando o espectro do mesmo ião que eluiu na fracção 52, com tempo de eluição superior, verificou-se que este tinha diferenças, principalmente nas abundâncias relativas. Neste isómero parece estar presente um oligossacarídeo acetilado com o grupo acetilo essencialmente numa hexose (por perda de -222Da) (**Figura 3.9., b₃**) e uma percentagem muito pequena de pentose acetilada. O facto do grupo acetilo não estar ligado à pentose é possível que faça com que este oligossacarídeo tenha menor volume hidrodinâmico eluindo mais tarde.

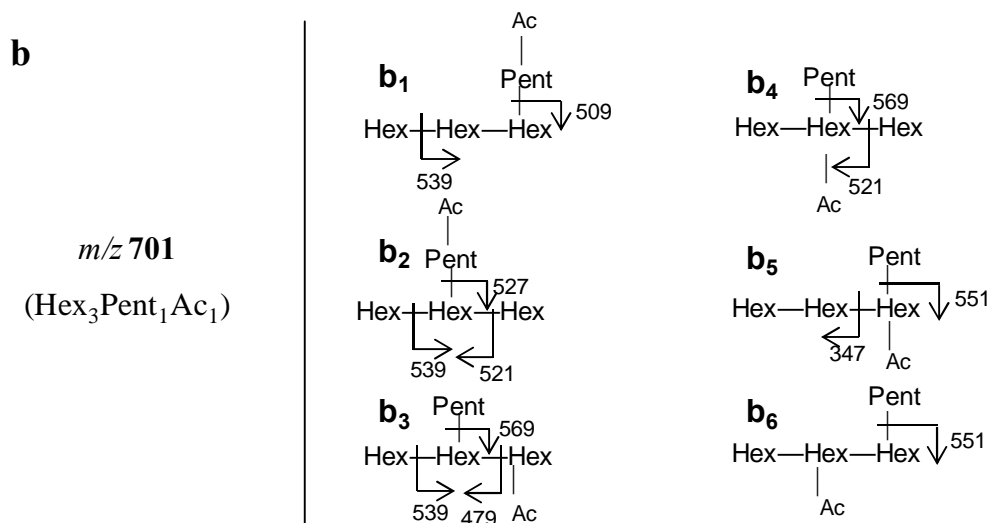


Figura 3.9. Estruturas dos oligossacarídeos Hex₃Pent₁Ac₁ (**b**) propostas com base no espectro de ESI-MS/MS do ião de m/z 701.

Analisando os espectros de MS/MS do tetrassacarídeo composto por três hexoses e uma pentose mas agora com dois e três grupos acetilos, iões de m/z 743 e 785 respectivamente, verifica-se que a acetilação parece ser preferencial na pentose. No caso do espectro do tetrassacarídeo diacetilado Hex₃Pent₁Ac₂, verifica-se a perda de pentose com um (ião de m/z 551) e dois grupos acetilo (ião de m/z 509). No espectro correspondente ao tetrassacarídeo Hex₃Pent₁Ac₃ vêm-se os iões correspondentes à perda de pentose com um (ião de m/z 623), dois (ião de m/z 551) e três grupos acetilos (ião de m/z 509). Baseado nesta fragmentação maioritária propõe-se uma série de estruturas possíveis para estes oligossacarídeos presentes na fracção 29 (**Figura 3.10.**, **c**₁-**c**₆ e **d**₁-**d**₈).

A perda de pentose não acetilada (-132 Da), correspondente ao ião de m/z 611 no espectro de tetrassacarídeo diacetilado e ao ião de m/z 653 no caso do espectro do tetrassacarídeo triacetilado, sugere a presença de estruturas em que a acetilação é verificada apenas nas hexoses. Devido à baixa abundância relativa deste iões fragmento, estas estruturas não serão maioritárias nesta fracção.

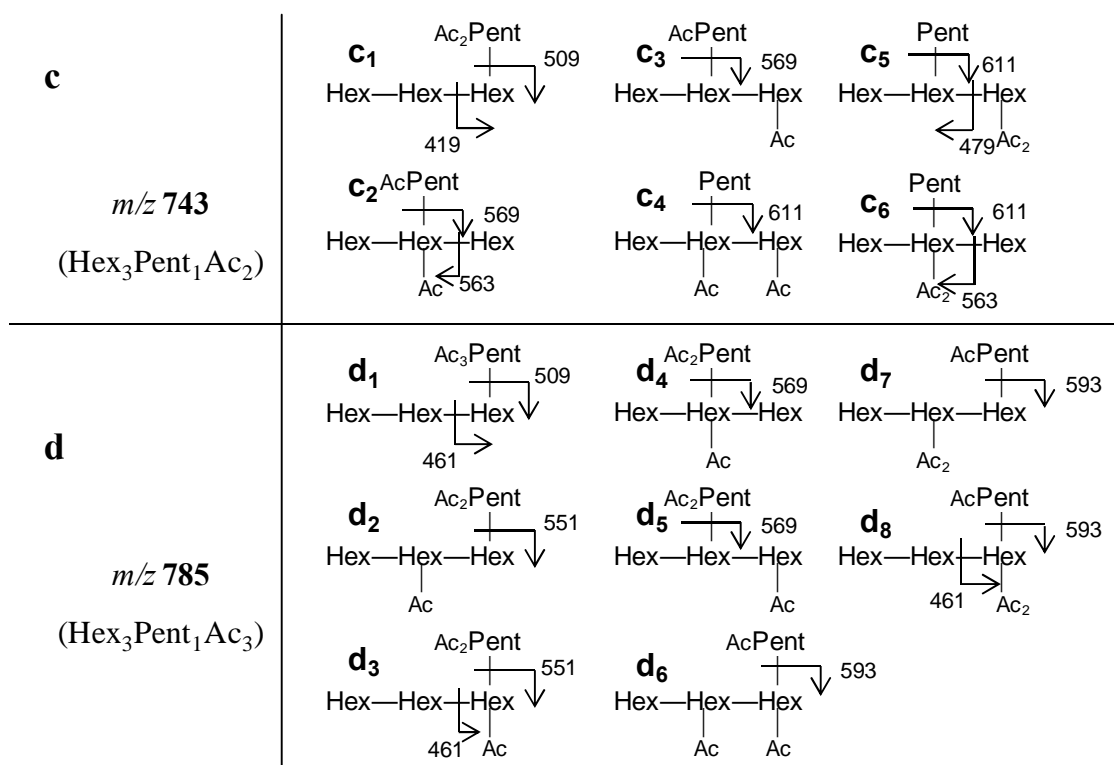


Figura 3.10. Estruturas dos oligossacarídeos Hex₃Pent₁Ac₂ (**c**) e Hex₃Pent₁Ac₃ (**d**), respectivamente, propostas com base nos espectros de ESI-MS/MS dos iões de m/z 743 e 785.

A acetilação nas pentoses da amostra pode ser devida ao facto de, aquando da acetilação, os OH livres das ramificações de pentoses estarem mais acessível à inserção dos grupos acetilo. No caso das mananas naturais a acetilação parece ser preferencial nas manoses (Nunes *et al.*, 2005)

3.5. Investigação do potencial efeito imunomodulador das mananas do café, nativas e acetiladas.

De modo a avaliar o efeito imunomodulador das mananas do resíduo de café foram testadas duas amostras provenientes de resíduo de café RC1 e RC2. Foi também avaliado o efeito imunomodulador de duas amostras de infusões de café, IC5 e IC10, e duas de *Aloe vera*, AV1 e AV2.

É importante remover os lipopolissacarídeos (LPS) das amostras. Para tal, estes foram removidos inicialmente através da eluição das amostras por uma coluna de afinidade Polimixina B. Esta molécula liga-se à cadeia lipídica do lipopolissacarídeo, removendo assim o LPS. Para confirmar que ocorreu remoção dos LPS das amostras foi realizado o teste de E-toxate. Verificou-se que estes foram removidos ($< 0,5$ unidades de endotoxina/mL). Assim, a actividade imunomoduladora a testar será apenas devida às amostras em estudo e não influenciada pela presença de LPS.

Os tipos de células linfocitárias estudadas foram os linfócitos B e os linfócitos T, especificamente os TCD8⁺ (T-citotóxicas) e os TCD4⁺ (T-reguladoras). A avaliação da actividade imunomoduladora foi realizada utilizando como técnica a citometria de fluxo.

3.5.1. Avaliação da activação de linfócitos B

Nos citogramas obtidos (**Figura 3.11., Figura 3.12. e Figura 3.13.**), o eixo das abcissas distingue as células linfocitárias em estudo das outras presentes e o eixo das ordenadas distingue as células activadas das não activadas, podendo assim no 1º quadrante visualizar-se o número de células activadas de um dado tipo (cada ponto corresponde a uma célula). A percentagem de activação é a razão entre o número de células activas (2º quadrante) e o número de células totais (1º e 4º quadrantes).

Como se esperaria, nos ensaios controlo com meio RPMI (controlo negativo) praticamente não houve activação de células, ao contrário do que se verifica nos ensaios com LPS (controlo positivo), onde há cerca de 90 % de activação.

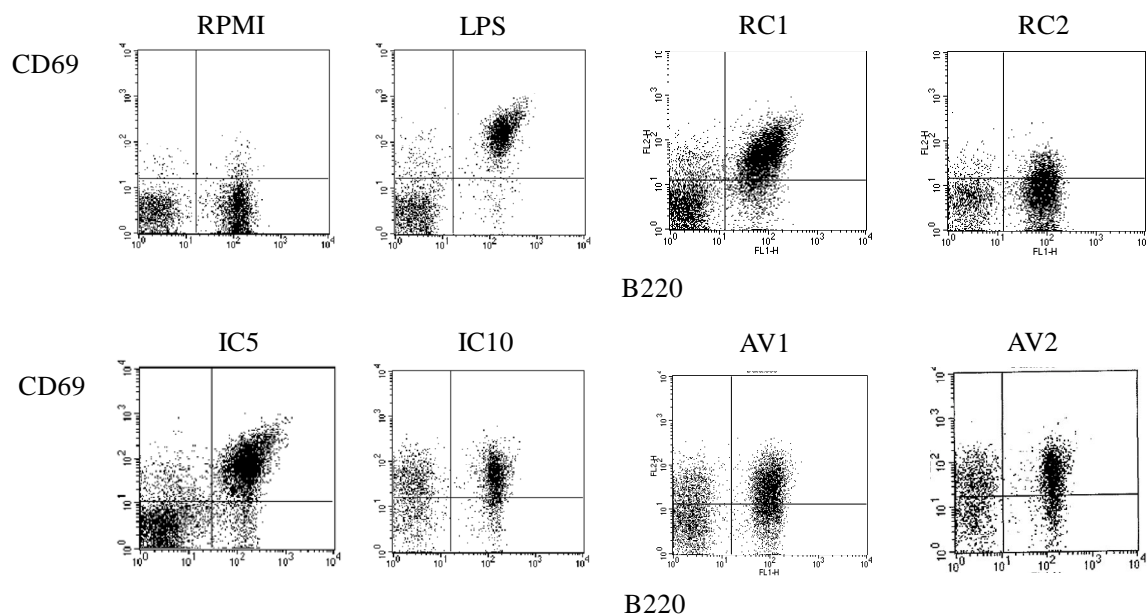


Figura 3.11. Expressão do CD69 à superfície de linfócitos B (B220) de ratinhos C57BL/6, devido ao estímulo de meio RPMI (controlo negativo), de LPS (controlo positivo) e das amostras RC1, RC2, IC5, IC10, AV1 e AV2.

Os valores de percentagem de activação dos linfócitos B induzida pelas amostras provenientes resíduo de café (RC1 e RC2), da bebida de café (IC5 e IC10) e dos extractos de *Aloe vera* (AV1 e AV2) em diferentes concentrações (100 $\mu\text{g/mL}$ - 6 $\mu\text{g/mL}$), estão apresentadas na **figura 3.12..** Como controlo dos ensaios é apresentado também a activação dos diferentes tipo de células por meio RPMI (controlo negativo) e por LPS (controlo positivo).

Nos ensaios de activação de linfócitos B (**Figura 3.12.**) verificou-se activação maioritária em RC1, IC5 e IC10 e em AV2.

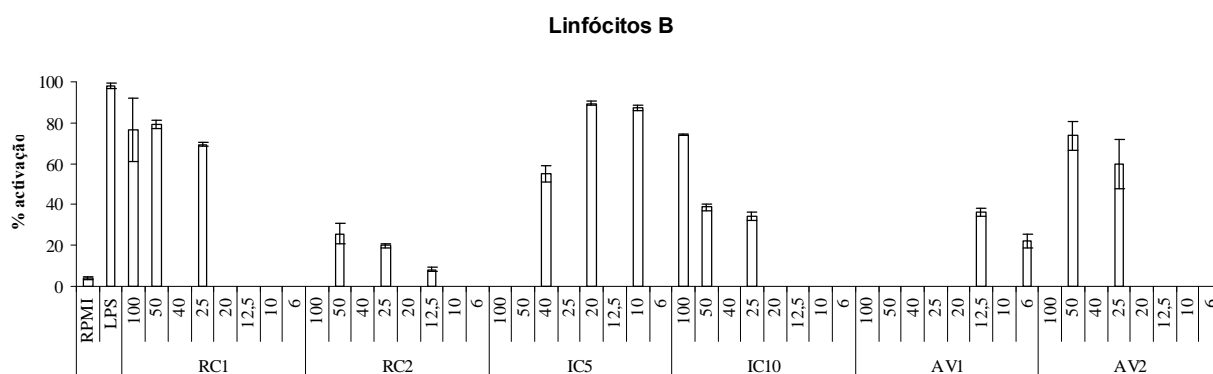


Figura 3.12. Efeito estimulatório, expresso como % de células CD69⁺, em células linfocitárias B tratadas *in vitro*, das amostras IC5, IC10, RC1, RC2, AV1 e AV2, em diferentes concentrações (100 µg/mL – 6 µg/mL).

A indução de activação em linfócitos B pelas amostras provenientes do resíduo de café, RC1 e RC2, é verificada em RC1 na ordem dos 80 % de activação, em concentrações de 100 e 50 µg/mL. Em RC2 a percentagem de activação é inferior, cerca de 20 %. Nestas amostras, à medida que a concentração diminui, diminui a percentagem de activação.

A activação de linfócitos B induzida pelas amostras provenientes das infusões de café, IC5 e IC10, é verificada em ambas. No caso de IC5, a percentagem de activação é superior à amostra com um grau de torra superior, IC10. O máximo de activação em IC10 é numa concentração de 100 µg/mL, contrariamente em IC5, as células morrem a estes valores de concentração, sendo o pico de activação (80 %) em valores de concentrações inferiores, de 20 e 10 µg/mL.

A amostra AV2, isolada de um extracto de *Aloe vera* apresenta valores de activação de aproximadamente 70 %, bastante superiores à amostra AV1, também proveniente de extracto de *Aloe vera*. Esta diferença poderá ser devida ao facto da fracção AV2 ser mais rica em manose do que a AV1, que é maioritariamente constituída por glucose (**Tabela 2.1**). AV1 apresenta 35 % de activação em concentração de 12,5 µg/mL. Para concentrações superiores verifica-se morte celular.

Comparando a amostra do resíduo de café RC1, as amostras provenientes de infusões de café e de *Aloe vera*, verifica-se uma activação semelhante, que sugere uma actividade imunomoduladora semelhante.

3.5.2. Avaliação da activação de linfócitos T

A activação dos linfócitos T induzida pelos polissacarídeos em estudo é verificada por análise dos citogramas das **Figura 3.13.** e **Figura 3.14.** Tal como nos ensaios de activação de linfócitos B, nos ensaios controlo com meio RPMI (controlo negativo) praticamente não houve activação de células, ao contrário do que se verifica nos ensaios com LPS (controlo positivo), onde há cerca de 90 % de activação.

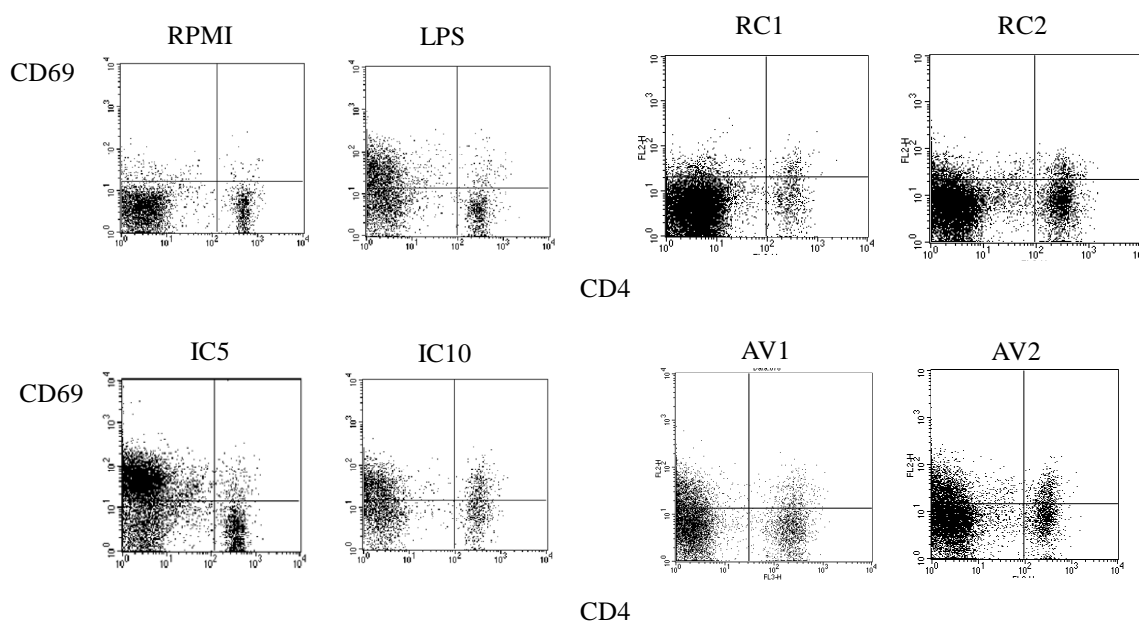


Figura 3.13. Expressão do CD69 à superfície de linfócitos TCD4⁺ (CD4) de ratinhos C57BL/6, devido ao estímulo meio RPMI (controlo negativo), de LPS (controlo positivo) e das amostras RC1, RC2, IC5, IC10, AV1 e AV2.

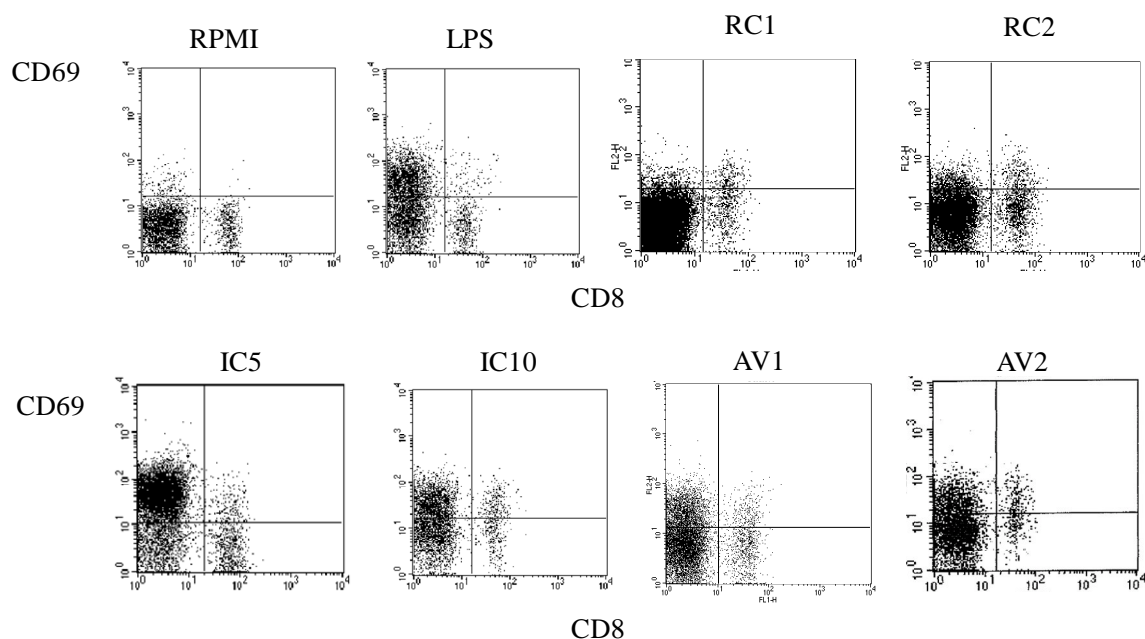


Figura 3.14. Expressão do CD69 à superfície de linfócitos TCD8⁺ (CD8) de ratinhos C57BL/6, devido ao estímulo de meio RPMI (controlo negativo), de LPS (controlo positivo) e das amostras RC1, RC2, IC5, IC10, AV1 e AV2.

Para se estudar a activação das amostras provenientes do resíduo de café e da infusão de café em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, fizeram-se alguns ensaios iniciais onde foi analisada a expressão de CD5 (não discrimina o tipo de célula T, se T-citotóxica ou T-reguladora). A activação de células do tipo TCD5⁺ é verificada principalmente nas amostras mais concentradas (100 µg/mL) de IC5 e IC10, cerca de 68 % de activação. Em RC1 a actividade é de 27 % e em RC2 é inferior a 10 % (**Figura 3.15.**).

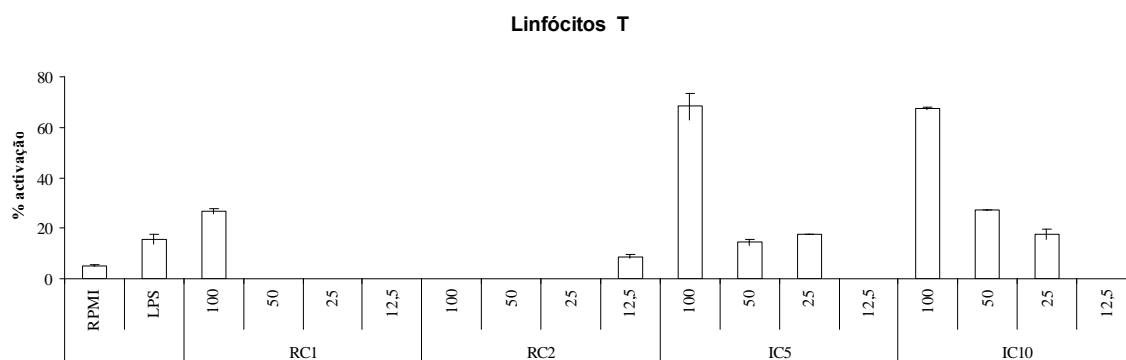


Figura 3.15. Efeito estimulatório de linfócitos T, *in vitro*, de meio RPMI (controle negativo), LPS (controle positivo) e das amostras RC1, RC2, IC5, IC10, AV1 e AV2, em diferentes concentrações (100 µg/mL – 6 µg/mL) através de ensaios de expressão de CD5.

Depois de verificada activação das células T nas amostras provenientes do resíduo de café e das infusões de café, foram feitos ensaios mais específicos, para avaliar a activação de células T-citotóxicas (TCD8⁺) (**Figura 3.16.**) ou de células T-reguladoras (TCD4⁺) (**Figura 3.17.**).

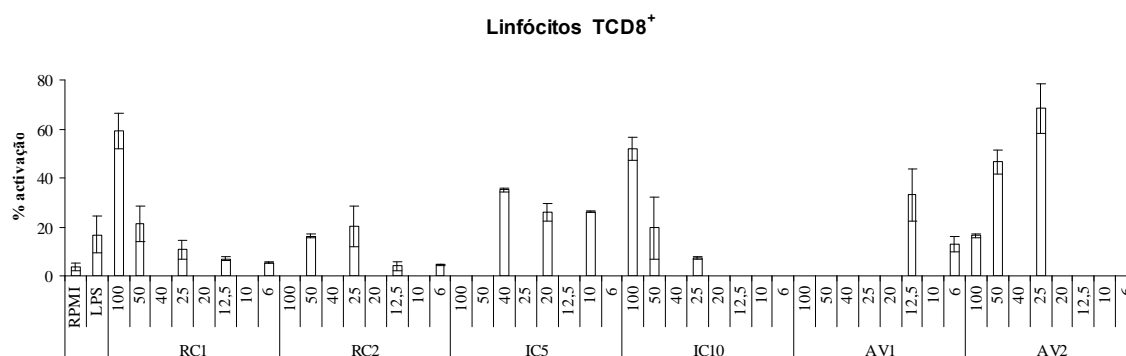


Figura 3.16. Efeito estimulatório de linfócitos TCD8⁺, *in vitro*, de meio RPMI (controle negativo), LPS (controle positivo) e das amostras RC1, RC2, IC5, IC10, AV1 e AV2, em diferentes concentrações (100 µg/mL – 6 µg/mL).

Os linfócitos TCD8⁺ são activados preferencialmente por RC1, IC5 e IC10 e por AV2 (**Figura 3.16.**).

A activação em RC1 é preferencial aquando de concentração de amostra de 100 µg/mL. Em RC2, os valores de concentração de amostra onde se verificou maior valor de activação (~ 20 %) foram 25 e 50 µg/mL. Em valores superiores de concentração de amostra (100 µg/mL) ocorreu morte das células em estudo.

A activação de linfócitos TCD8⁺ induzida pelas amostras provenientes de infusões de café, é verificada tanto em extractos provenientes de um café com grau de torra 5 % (IC5) como de um café com grau de torra de 10 % (IC10). No caso de IC5, esta activação de linfócitos TCD8⁺, apresenta valores na ordem dos 30 %, não se verificando grande variação na gama de concentração de amostra 40-10 µg/mL. Para concentrações superiores de amostra, tal como nos ensaios de activação de linfócitos B, verifica-se morte de células. Pelo contrário, em IC10, verificamos activação superior de células (~ 45 %) em concentração de amostra de 100 µg/mL. À medida que o valor de concentração de amostra no ensaio diminui o valor de activação de linfócitos TCD8⁺ também diminui.

Em AV2, extracto de *Aloe vera* rico em mananas, verificamos um comportamento semelhante a IC5: para concentrações inferiores de amostra ocorre maior activação de células. O pico máximo de activação (~ 60 %) em AV2 é verificado a uma concentração de amostra de 25 µg/mL. Em AV2 não se verifica morte das células aquando de concentrações superiores de amostra. Verifica-se este efeito de morte de células no outro extracto de *Aloe vera*, onde apenas no ensaio com 12,5 µg/mL manteve as células linfocitárias de estudo viáveis. Para este valor verificamos um valor de activação de cerca de 35 %.

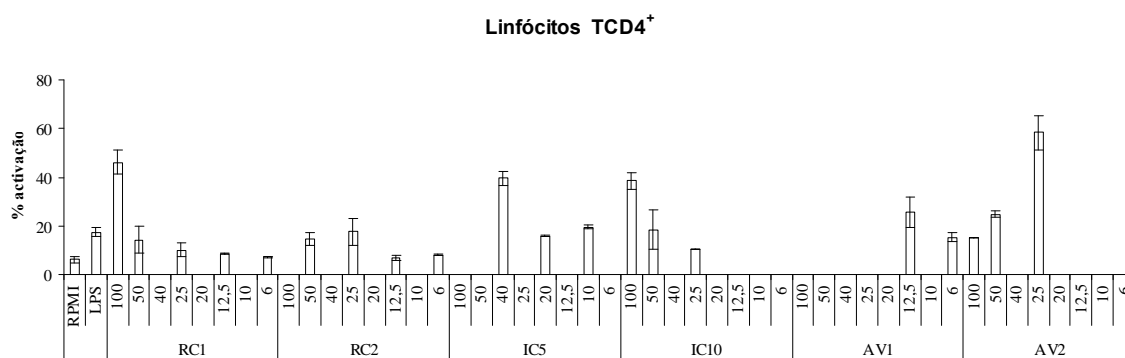


Figura 3.17. Efeito estimulatório de linfócitos TCD4⁺, *in vitro*, de meio RPMI (controlo negativo), LPS (controlo positivo) e das amostras RC1, RC2, IC5, IC10, AV1 e AV2, em diferentes concentrações (100 µg/mL – 6 µg/mL).

Os linfócitos TCD4⁺ são activados preferencialmente por RC1 (apenas em concentração de amostra de 100 µg/mL) por IC5 e IC10 e por AV2.

O comportamento das amostras testadas neste ensaio de activação de linfócitos TCD4⁺ (**Figura 3.17**) é semelhante ao ensaio de activação de linfócitos TCD8⁺ (**Figura 3.16**).

A activação em RC1 é preferencial para concentração de amostra de 100 µg/mL, sendo reduzida (~ 10 %) para concentrações de amostra inferiores (50-12,5 µg/mL). Em RC2, os valores de concentração de amostra onde se verificou maior valor de activação (~ 20 %) foram 25 e 50 µg/mL. Em valores superiores de concentração de amostra (100 µg/mL) ocorreu morte das células em estudo.

Estudando a activação de linfócitos TCD4⁺, induzida pelas amostras provenientes de infusões de café, verifica-se que IC5 apresenta activação de 40 %, em concentração de amostra de 40 µg/mL, não se verificando grande variação em gamas inferiores de concentração de amostra (20-10 µg/mL). Para concentrações superiores de amostra, tal como nos ensaios de activação de linfócitos B e TCD8⁺, verifica-se morte das células. Em IC10 verificamos activação superior de células (~ 40 %) em concentração de amostra de 100 µg/mL. À medida que o valor de concentração de amostra no ensaio diminui, o valor de activação de linfócitos TCD4⁺ também diminui.

Analisando os dois extractos de *Aloe vera*, AV2 apresenta elevada actividade deste tipo de linfócitos em estudo, TCD4⁺ (~ 60 %), a uma concentração de amostra de 25 µg/mL. Nesta amostra não se verifica morte das células aquando de concentrações superiores de amostra, ao contrário de AV1, para o qual em concentrações superiores de amostra se verifica uma diminuição da percentagem de activação destes linfócitos em estudo. Em AV1, verificamos um comportamento semelhante a IC5, para concentrações inferiores de amostra ocorre maior activação de células. Apenas a uma concentração de amostra de 12,5 µg/mL se obteve um ensaio onde as células linfocitárias de estudo estavam viáveis. Neste caso a activação foi de cerca de 25 %.

3.5.3. Ensaio de proliferação

Quando uma célula linfocitária é activada, esta poderá proliferar e diferenciar-se numa célula efectora. No caso dos linfócitos B, as células efectoras são plasmócitos, capazes de secretar anticorpos, e, no caso de células TCD8⁺, as células efectoras adquirem actividade citolítica capaz de promover apoptose da célula alvo (Abbas *et al.*, 2000).

Por análise da **figura 3.18.**, comparando os valores de proliferação das amostras com o valor de proliferação do controlo positivo (Concavalina A e LPS), verifica-se que tanto as amostras de café e de resíduo de café como a amostra de *Aloe vera*, não apresentaram um efeito na proliferação destas células.

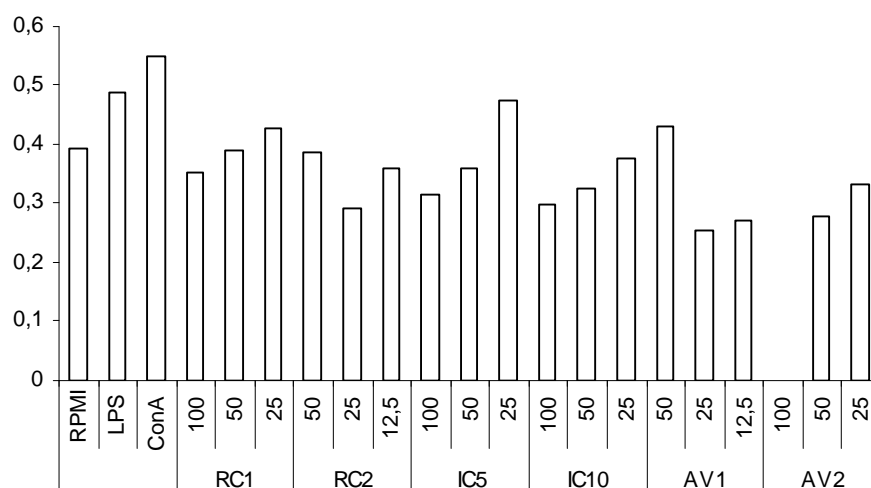


Figura 3.18. Efeito de indução de proliferação, *in vitro*, de meio, LPS, concanavalina A e das amostras RC1, RC2, IC5, IC10, AV1 e AV2, em diferentes concentrações (100 µg/mL– 12,5 µg/mL)

As citocinas, moléculas secretadas pelas células T-reguladoras, não intervêm directamente na lise ou na eliminação dos patogénicos, sendo a sua função auxiliar as outras células a fazê-lo. Assim, a indução da produção da citocina IL-10 pelas amostras testadas foi avaliada, tendo em conta a sua actividade imunossupressora (Abbas *et al.*, 2000). Nos ensaios feitos para avaliar a capacidade de indução na produção desta citocina, os resultados foram negativos em todas as amostras testadas, RC1, RC2, IC5, IC10, AV1 e AV2.

3.5.4. Ensaio de activação de macrófagos

Os macrófagos são células capazes de fagocitar e eliminar patogénicos que produzem espécies reactivas de oxigénio e azoto, entre eles o óxido nítrico. A produção deste é uma medida da activação dos macrófagos.

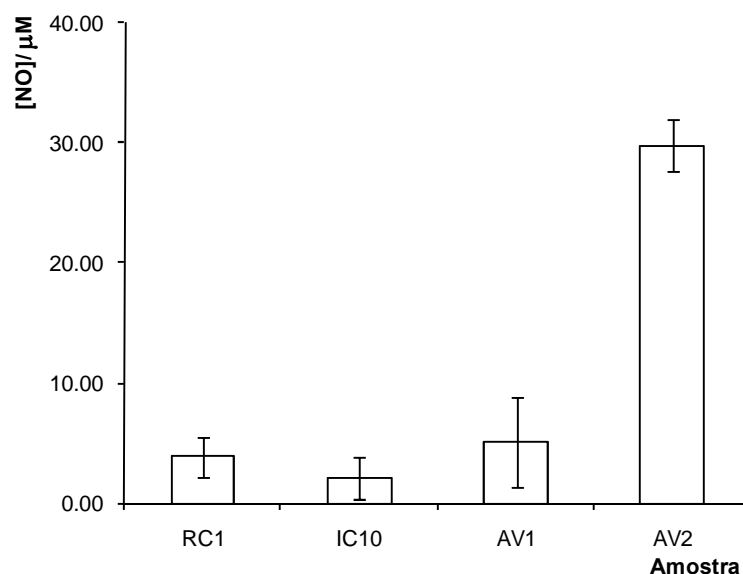


Figura 3.19. Quantidade de óxido nítrico produzido em resposta às amostras IC10, RC1, AV1 e AV2.

Não foram testadas as amostras IC5 e RC2.

A activação deste tipo de células é apenas verificada na presença de AV2 (**Figura 3.19.**). Zhang e Tizard (1996) descreveram a activação de macrófagos pelas acemananas de *Aloe vera*. As amostras provenientes do café e do resíduo de café não apresentaram capacidade de activação de macrófagos.

As respostas imunes dos macrófagos fazem parte da imunidade inata, de menor especificidade que a imunidade adquirida, pela qual são responsáveis os linfócitos. As respostas pelos linfócitos, ao contrário da desencadeada pelos macrófagos, promovem a memória imunológica. Esta é uma característica importante do sistema imune que lhe confere, por exemplo, a capacidade de responder mais rápida e intensamente a infecções repetidas por um mesmo microorganismo (Abbas *et al.*, 2000).

3.5.5. Ensaios *in vivo*

Foram feitos alguns ensaios preliminares, devido à reduzida quantidade de ratinhos utilizados como réplicas, de activação de células do sistema imune *in vivo*. Estes ensaios foram feitos em ratinhos C57BL/6 interperitonalmente. O controlo negativo usado foi ratinhos C57BL/6 injectados, também interperitonal mas, com tampão PBS.

Nestes ensaios, à semelhança com os resultados dos ensaios *in vitro*, observou-se activação de células B (**Figura 3.20.**) e T (TCD4⁺ e TCD8⁺) (**Figura 3.21.** e **3.22.**), sem proliferação de células.

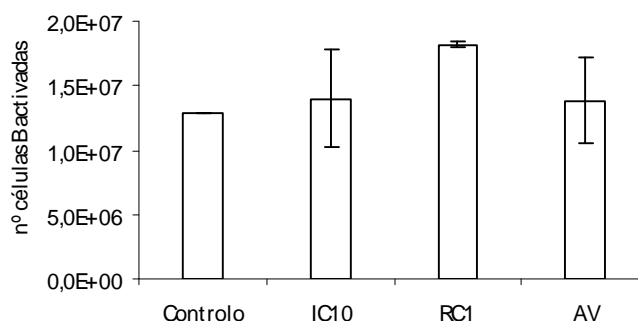


Figura 3.20. Número de células B activadas, em ensaios *in vivo*, em resposta às amostras IC10, RC1 e AV2.

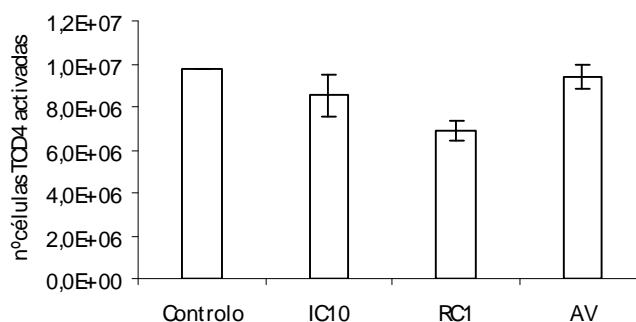


Figura 3.21. Número de células TCD4⁺ activadas, em ensaios *in vivo*, em resposta às amostras IC10, RC1 e AV2.

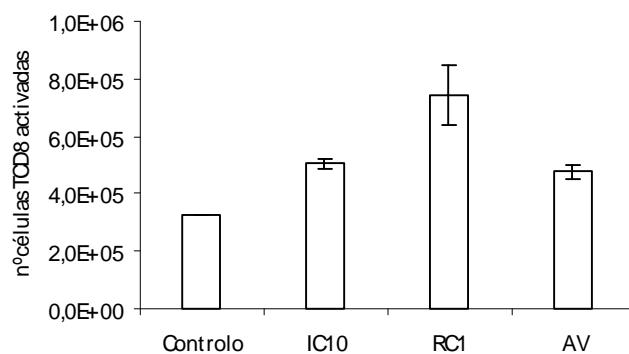


Figura 3.22. Número de células TCD8⁺ activadas, em ensaios *in vivo*, em resposta às amostras IC10, RC1 e AV2.

Estes resultados são bastante promissores e demonstram que as mananas têm potencial efeito imunomodulador.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES

As mananas do resíduo de café foram isoladas e purificadas com sucesso, sendo a acetilação a metodologia adequada para a obtenção de material solúvel em água e também de estruturas acetiladas.

Por espectrometria de massa tandem (ESI-MS/MS) foram caracterizadas as mananas acetiladas do resíduo de café, tendo-se verificado que estes polímeros foram acetilados, preferencialmente, nas ramificações de hexose e de pentose, havendo também acetilação nas hexoses da cadeia principal.

Estes polissacarídeos do resíduo de café modificados por acetilação foram testados quanto à sua actividade imunomoduladora. Estes apresentam actividade imunomoduladora semelhante à apresentada pelas fracções ricas em mananas provenientes de infusões de café e pelas mananas do *Aloe vera*, cuja acetilação ocorre exclusivamente nos resíduos de manose da cadeia principal. As diferentes amostras testadas, com diferentes tipos de padrão de acetilação, têm actividade imunomoduladora semelhante, sugerindo que esta actividade pode manifestar-se pela localização dos grupos acetilo em diferentes partes dos polímeros.

As mananas acetiladas do resíduo de café e as mananas das infusões de café testadas promovem a activação dos linfócitos B e T do sistema imune, sem efeito proliferativo de células. Não é verificada activação de macrófagos nem indução de efeito imuno-supressivo. Estes resultados são observados também para o *Aloe vera*, com excepção da activação de macrófagos, que neste caso foi positiva. Os resultados preliminares realizados *in vivo* encontram-se de acordo com as observações feitas *in vitro*, nomeadamente, a activação de linfócitos B e T sem proliferação de células.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que os polissacarídeos presentes no resíduo de café e na bebida de café têm propriedades imunomoduladoras importantes que deverão ser exploradas para prosseguir com estudos futuros.

CAPÍTULO 5

**PERSPECTIVAS DE
ESTUDOS FUTUROS**

O café é uma fonte ainda pouco explorada de mananas. Será interessante o estudo do efeito imunomodulador das mananas presentes nas infusões de café com vista à identificação das características determinantes para a sua actividade imunomoduladora. Devido ao elevado consumo de café no mundo, será importante e relevante identificar e caracterizar tal propriedade benéfica deste. Poderiam ser obtidos polissacarídeos, cujas semelhanças estruturais com outros, com actividades biológicas já identificadas, nos polímeros presentes nas infusões de café.

Por outro lado o aproveitamento e valorização das mananas do resíduo de café, um material produzido em larga escala, que não é objecto de aproveitamento nem de valorização terá também muito interesse e impacto económico.

Tendo em conta que as mananas de origem vegetal que exibem actividade biológica se encontram acetiladas, tal como as mananas de *Aloe vera*, será interessante estudar processos para produzir polímeros com diferentes graus de acetilação, permitindo seleccionar quais as estruturas que mais se relacionam com o potencial efeito imunomodulador atribuído a estes polímeros. Seria também interessante propor uma metodologia que possa ser utilizada para obter a partir do resíduo e de uma forma quantitativa e rentável, mananas com actividade imunomoduladora que valorizem o subproduto que é o resíduo do café.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K.; Lichtman, A.H.; Pober, J.S. (2000) Cellular and Molecular Immunology, 4th Edition, Saunders.
- Asam, M.R.; Glish, G.L. (1997) Tandem Mass Spectrometry of Alkali Cationized Oligosaccharides Using a Quadrupole Ion Trap, *Journal of American Society of Mass Spectrometry*, **8**, 987-995
- Bahr, U., Pfenninger, A., Karas, M. (1997) High sensitivity analysis of neutral underivatized oligosaccharides by nanoelectrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **69**, 4530- 4535
- Biswas, A.; Shogren, R. L.; Willett J. L. (2005) Solvent-Free Process to Esterify Polysaccharides. *Biomacromolecules*, **6**, 1843-1845.
- Blakeney, A.B., Harris, P.J., Henry, R.J., Stone, B.A. (1983) A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research*, **113**, 291- 299.
- Bradbury, A. G. W.; Halliday, D.J. (1990) Chemical structures of green coffee bean polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **38**, 389-392.
- Chow, J.T.N.; Williamson, D.A.; Yates, K.Y.; Gous, W.J. (2005) Chemical characterization of the immunomodulation polysaccharide of *Aloe vera* L. *Carbohydrate Polymers*, **340**, 1131-1142.
- Coimbra, M.A.; Delgadillo, I.; Waldron, K.W.; Selvendran, R.R. (1996) Modern Methods of Plant Analysis; Vol. 17, Plant Cell Wall Analysis; Edited by H.F. Linskens and J.F. Jackson; Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Daas, P.J.H.; Schols, H.A.; Jongh, H.H.J. (2000) On the galactosyl distribution of commercial galactomannans. *Carbohydrate Research*, **329**, 609-619.
- Domon, B.; Costello, C. E. (1988) A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentation in FAB-MS-MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate Journal*, **5**, 397-409.
- Dourado, F; Madureira, P; Carvalho, V; Coelho, R.; Coimbra, M.A.; Vilanova, M; Mota, M.; Gama, F.M. (2004) Purification, structure and immunobiological activity of an arabinan-rich pectic polysaccharide from the cell walls of *Prunus dulcis* seeds. *Carbohydrate Research*, **339**, 2555-2566.

- Ehlers, G.M. (1980) Possible applications of enzyme in coffee processing. In Proceeding of 9th International Colloquium on the Chemistry of coffee, ASIC: Paris, pp 267-271.
- Femenia, A.; García-Pascual, P.; Simal, Susana; Rosselló, C. (2003) Effects of heat treatment and dehydration on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydrate Polymers*, **51**, 397-405.
- Fernández, L.E.M.; Obel, N.; Scheller, H.V.; Roepstorff, P. (2003) Characterization of plant oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **38**, 427- 437.
- Fischer M.; Reimann S.; Trovato V.; Reddgwell R.J. (2001) Polysaccharides of green arabica and robusta coffee beans. *Carbohydrate Research*, **330**, 93-101.
- Harvey, D.J. (2000) Electrospray Mass spectrometry and fragmentation of N-linked carbohydrates derivatised at the reducing end. *Journal of American Society Mass Spectrometry*, **11**, 900- 915.
- Harvey, D.J. (2006). Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: an update covering the period 1999-2000. *Mass Spectrometry Reviews*, **25**, 595-662.
- Harvey, D.J.; Bateman R.H.; Green, M.R. (1997) High-energy collision-induced fragmentation of complex oligosaccharides ionized by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **32**, 167-187.
- Hoebler, C.; Barry, J.L.; David, A.; Delort-Laval, J. (1989) Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **37**, 360-367.
- Hofmeister, G.E.; Zhou, Z.; Leary, J.A. (1991) Linkage position determination in lithium-cationized disaccharides- tandem mass-spectrometry and semiempirical calculations. *Journal of the American Chemical Society*, **113**, 5964-5970.
- <http://www.manualmerck.net>
- http://www.top100espresso.com/coffee_consumption_statistics_report.html
- Huisman, M.M.H.; Brull, L.P.; Thomas-Oates, J.E.; Haverkamp, J.; Schols, H.A.; Voragen, A.G.J. (2001) The occurrence of internal (1→5)-linked arabinofuranose

- and arabinopyranose residues in arabinogalactan side chains from soybean pectic substances. *Carbohydrate Research*, **330**, 103- 114.
- Hussein, M.M.-D.; Helmy, W.A.; Salem, H.M. (1998) Biological activities of some galactomannans and their sulphated derivatives. *Phytochemistry*, **48**, 479-484
- Illy, A.; Viani, R. (1995) Espresso Coffee- The Chemistry of Quality. Academic Press: London, capítulo 1,5-7.
- Lee, J.K.; Lee, M.K.; Yun, Y.P.; Kim, Y.; Kim, J.S.; Kim, Y.S.; Kim, K; Han, S.S.; Lee, C.K. (2001) Acemannan purified from *Aloe vera* induces phenotype and functional maturation of immature dendritic cells. *International Immunopharmacology*, **1**, 1275-1284.
- Leloup, V.; Liardon, R. (1993) Analytical characterisation of coffee carbohydrates. In Proceedings of 15th International Colloquium on the Chemistry of Coffee; ASIC: Paris, pp 863-865.
- Maier, H.G. (1975) Linkage of flavour compounds to the coffee powder matrix (German). In Proceeding of 7th International colloquium on the Chemistry Coffee; ASIC: Paris, pp 211-219.
- Maier, H.G.; Buttler, H. (1973) About the isolation and characterization of the brown coffee residue (German). *Zeitschrift. Lebensmittel-Untersuchung und- Forschung*, **150**, 331-334.
- Navarini, L.; Gilli, R.; Gombac, V.; Abatangelo, A.; Bosco, M.; Toffanin, R. (1999) Polysaccharides from hot water extracts of roasted *Coffea arabica* beans: isolation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, **40**, 71-81.
- Nunes, C.; Rocha, S.M.; Coimbra, M.A.(2006b) Simple and solvent-free methodology for quantification of methanol and acetic acid content of plant polysaccharides based on headspace solid phase microextraction-gas chromatography (HS-SPME-GC-FID). *Carbohydrate Polymers*, **64**, 306-311.
- Nunes, F.M.; Coimbra, M.A. (1998) Influence of polysaccharide composition in foam stability of espresso coffee. *Carbohydrate Polymers*, **37**, 283-285.
- Nunes, F.M.; Coimbra, M.A. (2001) Chemical Characterization of the High Molecular Weight Material Extracted with Hot Water from Green and Roasted Arabica Coffee, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 1773-1782.

- Nunes, F.M.; Coimbra, M.A. (2002a) Chemical characterization of the high molecular weight material extracted with hot water from green and roasted robusta coffee as affected by the degree of roast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 7046-7052.
- Nunes, F.M.; Coimbra, M.A. (2002b) Chemical characterization of galactomannans and arabinogalactans from two arabica coffee infusions as affected by the degree of roast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 1429-1434.
- Nunes, F.M.; Coimbra, M.A., Duarte A.C., Delgadillo I. (1997) Foamability, foam stability, and chemical composition of espresso coffee as affected by the degree of roast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 3238-3243.
- Nunes, F.M.; Domingues, M.R.; Coimbra, M.A. (2005) Arabinosyl and Glucosyl Residues as Structural Features of Acetylated Galactomannans from Green and Roasted Coffee Infusions. *Carbohydrate Research*, **340**, 1689-1698.
- Nunes, F.M.; Reis, A.; Domingues, M.R.; Coimbra, M.A. (2006a) Characterization of Galactomannan Derivatives in Roasted Coffee Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 3428-3439.
- Oosterveld, A.; Harmsen, J.S.; Voragen, A.G.J., Schols (2002) Extraction and Characterization of polysaccharides from green and roasted Coffee Arabica beans. *Carbohydrate Polymers*, **52**, 285-296.
- Oosterveld, A.; Voragen, A.G.J., Schols (2003) Effect of roasting on the carbohydrate composition of Coffea arabica beans. *Carbohydrate Polymers*, **54**, 183-192.
- Petrarcco M. (2001) Espresso coffee foam: A maillard-mediated phenomenon? Description and analytical characterization; Vol. 2, Melanoidins in Food and Health; COST 919, European Commission, Luxembourg, pp 31-42.
- Redgwell, R. J.; Trovato, V.; Curti, D.; Fischer, M. (2002) Effect of roasting on degradation and structural features of polysaccharides in Arabica coffee beans. *Carbohydrate Research*, **337**, 421-431
- Reis, A.; Coimbra, M.A.; Domingues, P.; Ferrer-Correia, A.; Domingues, M.R.M. (2002). Structural characterization of underivatized olive pulp xylo-oligosaccharides by mass spectrometry using matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray ionisation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **16**, 2124-2132.

- Reis, A.; Coimbra, M.A.; Domingues, P.; Ferrer-Correia, A.; Domingues, M.R.M. (2004a). Fragmentation pattern of underivatised xylo-oligosaccharides and their alditol derivatives by electrospray tandem mass spectrometry. *Carbohydrate Research*, **55**, 401-409.
- Reis, A.; Domingues, M.R.M.; Domingues, P.; A.J. Ferrer-Correia, A.; Coimbra, M.A. (2003) Positive and negative Electrospray tandem Mass Spectrometry as a tool for structural characterisation of acid released oligosaccharides from olive pulp glucuronoxylans. *Carbohydrate Research*, **338**, 1497-1505.
- Reis, A.; Pinto, P.; Coimbra, M.A.; Evtuguin, D.V.; Neto, C.P.; Ferrer Correia, A.J.; Domingues, M.R.M. (2004b) Structural differentiation of uronosyl substitution patterns in acidic heteroxylans by electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of American Society of Mass Spectrometry*, **15**, 43-47.
- Silva, B.P.; Wood, P.J. (2000) Immunologically active polysaccharides from *Centrosema pubescens*. *Carbohydrate Polymers*, **71**, 516-521.
- Silva, M.A.; Nebra, S.A. ; Silva, M.J.M. ; Sanchez, C.G. (1998) The use of biomass residues in the brazilian soluble coffee industry. *Biomass Bioenergy*, **14**, 457- 467.
- Spiller, M.A. (1998) Caffeine; Chapter 6, The Chemical compounds of Coffee; Edited by Spiller, G.A.; CRC Press LLC.
- Stimple, M.; Proksch, A.; Wagner, H.; Lohman-Mathes, M.-L. (1984) Macrophage Activation and Induction of Macrophage Cytotoxicity by purified Polysaccharide Fractions from the Plant *Echinacea purpurea*. *Infection and Immunity*, (December) 845-849
- Thaler, H.; Arneth W. (1968) Investigations in coffee and coffee substitutes. IX The polysaccharides of *Coffea Arabica* green beans (German). *Z. Lebensm.-Untersuch.-Forsch.*, **138**, 26-35.
- Tischer, C.A.; Iacomini, M.; Gorin, A.J. (2002) Structure of the arabinogalactan from gum tragacanth (*Astragalus gummifer*). *Carbohydrate Research*, **337**, 1647- 1655.
- Turowski, R.C.; Triozzi, P.L. (1994) Application of chemical immunomodulators to the treatment of cancer and AIDS. *Cancer Investigation*, **12(6)**, 620-43
- Yamada, H. (1994) Pectin polysaccharides from Chinese herbs: structure and biological activity. *Carbohydrate Polymers*, **25**, 269-275.

- Yen, W.J; Wang, B.S.; Chang, L.W.; Duh, P.D. (2005) Antioxidant Properties of Roasted Coffee Residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 2658-2663.
- Zaia, J. (2004) Mass Spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrometry Reviews*, **23**, 161-227.
- Zhang, L.; Tizard, I.R. (1996) Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: The major carbohydrate fraction from *Aloe vera* gel. *Immunopharmacology*, **35**, 119-128.